

In memoriam Inczedy János



Inczy János (1923-2012)*

Életének 90. évében, 2012. december 10-én elhunyt Inczedy János okleveles vegyész mérnök, az MTA rendes tagja, az analitikai kémia nemzetközi hírű kutatója, nyugalmazott egyetemi tanár.

Inczy János 1923. június 26-án született. 1946-ban szerzett vegyész mérnöki oklevelet a József Nádor Műszaki és Gazdasági Egyetemen. Az iparban eltöltött néhány év után 1951-től 1970-ig a Budapesti Műszaki Egyetem Általános és Analitikai Kémia Tanszékén oktatott és kutatott. Az 1950-es évek elején kezdte el kutatásait az ioncserélők területén, amelynek eredményeivel később világhírnévre tett szert. 1957-ben szerezte meg a kémiai tudomány kandidátusa, majd 1966-ban a kémiai tudomány doktora fokozatot.

1970-ben kinevezték a Veszprémi Vegyipari Egyetem Analitikai Kémia Tanszékére tanszékvezető egyetemi tanárnak és az MTA Analitikai Kémia Kutatócsoportja vezetőjének. 1980–81-ben a Veszprémi Vegyipari Egyetem rektora volt.

Teljes körűen átszervezte és modernizálta az analitikai kémia és műszeres analitika oktatását a Veszprémi Egyetemen. A *Kémiai analízis alapvető módszerei*, az *Anyagszerkezeti vizsgálatok*, a *Folyamatos és automatikus elemzés* című jegyzetei évtizedeken keresztül meghatározóak voltak a vegyész mérnök képzésben. Új egyetemi képzést alapított

1984-ben a Budapesti Műszaki Egyetem Villamosmérnöki Karával közös képzésben, Műszer- és Méréstechnika szak néven.

Tudományos érdeklődése szerteágazó volt, és elsősorban az ioncserélők alkalmazásával, valamint a folyamatos és automatikus elemzés kérdéseivel foglalkozott. Az *Ioncserélők analitikai alkalmazása* című könyve 1962-ben magyarul, majd németül, és angol nyelven is megjelent. 1970-ben adták ki a *Komplex egyensúlyok analitikai alkalmazása* című könyvét, amelyet négy nyelvre is lefordítottak. 1984-ben megjelent a *Folyamatos és automatikus analízis* című könyve, amely a dinamikus rendszerek analitikai kémiájának alapjait és gyakorlati alkalmazását foglalja össze.

Tevékenyen részt vett a IUPAC munkájában. Az Analitikai kémia osztály titkára, majd 1981–1985 között elnöke volt. A IUPAC 1998-ban megjelent analitikai kémiai nevezéktani kötetének – *Compendium of Analytical Nomenclature (The Orange Book)* – főszerkesztője volt.

1976–1980 között a Magyar Kémikusok Egyesületének alelnöke, majd 1981–1990 között elnöke volt. Kezdeményezte és megszervezte a *Symposium on Ion Exchange at Lake Balaton* konferenciasorozatot 1963–1990 között.

Tudományos és oktató munkájáért számos kitüntetésben részesült. 1965-ben Akadémiai Díjjal, 1980-ban Állami Díjjal tüntették ki; a MTESZ-díj, a Than Károly-emlékérem, a Schulek Elemér-emlékérem kitüntetésekben részesült. A moszkvai Mengyelejev Egyetem díszdoktora lett 1981-ben, 1988-ban megkapta a Veszprémi Egyetem Pro Universitate Vespriensi arany fokozatát.

1993-ban az MTA levelező tagjává, 2001-ben rendes taggá választották. A Veszprémi Egyetem 1995-ben a Professor Emeritus cím, majd 2001-ben a Honoris Causa doktor cím adományozásával ismerte el az egyetem érdekében végzett tevékenységét.

Rendkívüli hittel és elhivatottsággal tanította fiatal kollégáit. Hitének és tudományos világképének alapjait egy könyvecskében foglalta össze, amely 2008-ban jelent meg *Hitünk és a Világ* címmel. Tanulmányát azzal az aggódással és szándékkal készítette, hogy a felnövekvő generációk sorsa sikeres, életük békés legyen.

Inczy János emlékét őrizve méltán lehetünk hálásak emberségéért, életművéért és mindazért, amit alkotott.

Felinger Attila

*Fotó: Szabó László, Pannon Egyetem

A műszeres módszerek térhódítása a hazai gyógyszerkutatásban*

SOHÁR Pál**

ELTE TTK Kémiai Intézet

A Magyar Kémikusok Egyesülete korábban felkérte a szerzőt egy olyan könyv szerkesztésére, amely a terület szakemberei számára összefoglalja a gyógyszerkutatásban alkalmazható műszeres módszerek legalapvetőbb elméleti ismereteit, mérés-technikai tudnivalóit és alkalmazási lehetőségeit. Kikérve a három nagy hazai gyógyszergyár illetékes szakemberinek véleményét a tervezett könyv tematikájáról, a tárgyalandó műszeres módszerek több tucatját felsoroló lista állt össze. Mivel a listán szereplő valamennyi módszer tárgyalása messze meghaladta volna az ésszerűség és a reális lehetőségek kereteit, a legfontosabbnak tekinthetőkre szűkítve a listát, tíz fejezet megírását tűztük ki célul:

Diffrakciós módszerek, elektron-spektroszkópia és minőségbiztosítás, elválasztás-technika, emissziós spektroszkópia, NMR spektroszkópia, IR spektroszkópia, NIR spektroszkópia, pásztázó elektron-mikroszkópia, termogravimetria és tömegspektrometria.

Amikor napirendre került az ez évi MTA közgyűléshez csatlakozó osztály-előadó ülés tematikájának kiválasztása, Blaskó Gábor akadémikus javaslatára a Kémiai Tudományok Osztálya úgy határozott, hogy az ülés foglalkozzék a tervezett könyv anyagával átfedő tudományterülettel, s az előadók a könyvfejezetek leendő szerzői legyenek. Így, miközben a szóban forgó kiadvány jövője – anyagi források hiányában – egyelőre bizonytalan, a tématerület az előadói ülésen nyilvánosságot kapott.

A műszeres módszerek megjelenése és elterjedése Magyarországon a múlt század második harmadának kezdetével esik egybe. Mint minden újdonság, e módszerek is csak fokozatosan, gyakran hosszán tartó bizalmatlanságot, sőt ellenállást legyőzve hódították meg a későbbi felhasználókat, a kémiai kutatásokkal, s ezen belül a gyógyszerkutatással foglalkozó szakembereket. Eleinte gyanakvással, kételkedéssel, afféle „úri huncutságnak” bélyegezve tekintett a vegyésztársadalom az új módszerekre. Azok a szakemberek, akik egy-egy módszer hazai úttörői voltak, nemcsak elődök, tanítómesterek nélkül kellett elsajátítsák a választott módszer elméleti alapjait, gyakorlati ismereteit és felhasználási területeit, de el kellett oszlassák a kezdetben fennálló bizalmatlanságot, meg kellett győzzék - úgyszólván egyenként - kutató kollegáikat a mérések hitelességéről, a segítségükkel szerzett információk megbízhatóságáról, s a levont következtetések helytállóságáról.

És bizony előfordult, hogy a következtetések, a mérési eredményekre alapozott feltételezett szerkezetek tévesnek bizonyultak. Egyes mérési módszerek mindmáig, de eredetileg szinte valamennyi, csak közvetett adatokat, könnyen félreértelmezhető információkat szolgáltatott

és elegendő tapasztalat hiányában a téves interpretáció lehetősége mindig fennállt. Egy-egy hibás következtetés, téves szerkezet sok-sok sikeresen megoldott kutatási feladatot feledtetett és élesztette újra az adott módszer iránti idegenkedést.

Ellenkező előjelű veszély is fenyegette a szerkezetkutatót: egy-egy fontosabb kutatási probléma sikeres megoldása túlzott elvárásokat szült és olyan kérdések tisztázását kívánták meg a szakembertől, amelyekre a módszer alkalmazatlan volt. E szkillák és karibdiszek között lavírozva kellett a szerkezetkutatónak, spektroszkópus szakembernek módszere számára kollegáit megnyerni, miközben eleinte maga is gyakorlatlan kezdőként ismerkedett a számára is csak fokozatosan feltáruló lehetőségek és csapdák világában. Megérdemlik tehát a műszeres módszerek hazai pionírjai, „alapító atyjai”, az utánuk jövők tanítómesterei, hogy a mai előadói ülésen, az itt elhangzó előadásokkal tisztelegjünk előttük, fejet hajtunk kimagasló teljesítményük előtt, amelyeknek haszonélvezői az utánuk jövő nemzedékek.

A műszeres módszerek közül elsőként a látható és ultraibolya (röviden UV) spektroszkópia jelent meg a hazai kutatási eszközök között. A Szegedi Egyetem Fizikai Kémiai Tanszékének vezetője Kiss Árpád (1889 – 1968) kezdeményezett UV-spektroszkópiái és kvantumkémiai kutatásokat az 1920-as évek közepén. Főként átmeneti-fém vegyületek, fém-komplexek vizsgálatával foglalkozott. Számos, nagytekintélyű spektroszkópus, elméleti kémikus és szerkezetkutató került ki az általa alapított iskolából.



Kiss Árpád

Az 1930-as évek elején a Budapesti Műszaki Egyetemen a tragikusan fiatalon elhunyt Schmid Rezső (1904 – 1939) honosította meg az UV-spektroszkópiái kutatásokat,

*A Kémiai Tudományok Osztálya 2012. évi MTA -közgyűléshez csatlakozó előadói ülésén elhangzott előadás nyomán.

**E-mail cím: sohar@chem.elte.hu

kétatomos molekulák spektrumának vizsgálatára koncentrálna. Rövid pályafutása nemcsak ahhoz volt elegendő, hogy az elméleti kutatásokban és a spektroszkópiai mérés technikában érjen el jelentős eredményeket, de ahhoz is, hogy évtizedeken át sikeresen működő, sok kiváló szakembert felnevelő iskolát teremtsen. Kutatásait többek között Budó Ágoston és Gáspár Rezső, a BME Atomfizikai Tanszékén Bay Zoltán és Kovács István, a Fizikai Kémia Tanszéken Varsányi György folytatták. 1949-től Kovács István a kétatomos molekulák elméleti vizsgálatát a KFKI Optikai Spektroszkópiai Laboratóriuma vezetőjeként is folytatta, ahol munkatársa Szőke József műszerfejlesztési, illetve -építési feladatokat végzett.



Schmid Rezső

A gyógyszeripar 1962 táján „fedezte fel” az UV-spektroszkópiát. A Richter gyárban Bayer Jenő és Görög Sándor akadémikus vezették be az UV-módszert. A B₁₂ vitamin analitikájában és szteroid-kutatásokban használták fel a mérési eredményeket. Velük egy időben Horváth Gábor a Chinoin Gyógyszergyárban kezdett foglalkozni UV-mérésekkel és a spektroszkópiai adatokat elsősorban heterociklusok szerkezetigazolásában, és benzol-származékoknál a szubsztitúciós hatások tanulmányozásában hasznosította. A terület elismert szaktekinvélye Láng László UV-spektrumatlaszt szerkesztett, amelynek az Akadémiai Kiadó 24 kötetét jelentette meg.

A hazai krisztallográfiai kutatások elindítója Náray-Szabó István (1899 – 1972) volt, aki külföldi tanulmányútjáról (amelyet a szakterület Nobel-díjas megalapítója, Bregg mellett töltött) hazatérve, 1930-ban a Szegedi Egyetemen röntgendiffrakciós laboratóriumot hozott létre. 1938-tól a II. Világháború végéig a Műegyetem Fizikai Kémiai Tanszékének vezetőjeként folytatta kutatásait Sasvári Kálmán munkatársával, a szakterület doyenjével, akinek 100. születésnapját nemrég ünnepelehték meg barátai és kollégái. A műegyetemi professzorok rosszemlékű koncepció perének áldozataként több évre meg kellett szakítania kutatómunkáját és derékba tört karrierjének folytatására csak 1956-tól nyílt lehetősége az MTA Központi Kémia Kutatóintézetében. Pályafutásának utolsó másfél évtizede elegendő volt arra, hogy kutatócsoportjával egy nemzetközileg elismert, kiemelkedő teljesítményekkel büszkélkedő iskolát teremtsen, amelynek vezető

kutatói Kálmán Alajos akadémikus, Czugler Máttyás – a csoport jelenlegi vezetője –, Párkányi László és Argay Gyula valamennyien tudományterületük kiemelkedő szaktekinvélyei.



Náray-Szabó István

A KKKI kutatócsoportja egy emberöltőn át a krisztallográfiai kutatások egyetlen hazai bázisaként széleskörű együttműködést alakított ki szinte valamennyi számottevő magyarországi kémiai kutatóhellyel, közöttük a gyógyszergyárakkal és ipari gyógyszerkutató intézetekkel, így a Chinoinnal is. A Chinoin kitűnő szakembere, nemrég elhunyt kollegánk, Simon Kálmán, évtizedeken át a KKKI-beli kutatókkal, az ott működő mérőberendezéseket felhasználva közösen oldotta meg a gyári szerkezetkutatósi feladatokat és csak 1991-ben került sor saját műszer beszerzésére a Chinoinban. Két évvel később, 1993-ban az ELTE Kémiai Tanszék csoportjában Náray-Szabó Gábor akadémikus vezetésével krisztallográfiai laboratóriumot létesítettek és helyeztek üzembe egy modern krisztallográfot. Újabb három év elteltével, 1996-ban a Debreceni Egyetem is csatlakozott a hazai Röntgen-készülék tulajdonosokhoz. Ez a műszer máig az egyetlen vidéken üzemelő ilyen berendezés. Működtetője Bényei Attila a Fizikai Kémia Tanszéken.

Az elválasztás-technika, elsősorban a gázkromatográfia ma már minden kémiai laboratórium nélkülözhetetlen tartozéka. A vegyészeti munkát segítő műszeres módszerek fegyvertárát Magyarországon az 1930-as évek utolsó harmadától kezdve gyarapítja. Az első, 1937-ben megjelent kromatográfiával foglalkozó tankönyvet a Pécsi Egyetem oktatói, Cholnoky László és Zechmeister László írták. E témáról Szepesy László egész könyvsorozatot tett közzé (1961, 1963, 1970, 1986). A tudományterület kiemelkedő sikerű, fél tucat idegen nyelvű kiadásban is megjelent monográfiája az ioncsereleokról készült, szerzője Inczedy János akadémikus. A hazai gázkromatográfiai kutatások kiemelkedő szaktekinvélye volt nemrég elhunyt akadémikus-társunk Nyiredy Szabolcs (1950 – 2006).

A BME Analitikai Tanszékén 1962 óta foglalkoznak termoanalitikai vizsgálatokkal. Ezek kezdeményezője Paulik Ferenc (1922 – 2005) volt, aki testvérével, Paulik Jenővel fejlesztette ki a széles körben elterjedt termogravimétert. Ez az igen népszerűvé vált kisműszer valódi „hungarikum”-nak tekinthető.



Paulik Ferenc

A kiroptikai spektroszkópia magyarországi „atyja” Kajtár Márton (1929 – 1991), a kiemelkedő pedagógus és sokoldalú, kiváló kutató. Kajtár, aki kezdetben szintetikus peptid-kémiával foglalkozott, 1967 táján kezdett érdeklődni az ORD módszer iránt és egy bonni tanulmányutat követően, amidőn 1970-ben Humboldt-ösztöndíjasként egy évig Günther Snatzke professzor, a CD- és ORD-spektroszkópia nemzetközi szaktekintélye mellett dolgozott, teljes kutatókapacitását ennek a tudományterületnek szentelte. Szintetikus kollegáival együttműködve nemcsak a legkülönbözőbb vegyületek szerkezet-vizsgálatában vett részt, de a terület elméletét is alapvető új felismerésekkel gazdagította. Nevéhez fűződik pl. a tioamidok u. n. szektor-szabályának kidolgozása.

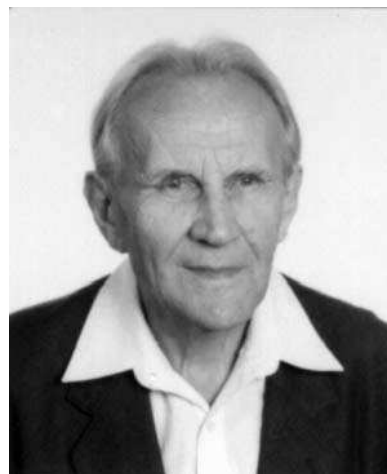


Kajtár Márton

ORD-méréseket szórványosan korábban mások is végeztek – így a Szegedi Egyetem Szerves Kémiai Intézetében az ötvenes évek végén, az MTA Biokémiai Kutatóintézetében a hatvanas évek közepe táján, peptidok, illetve fehérjék szerkezetvizsgálata eszközeként –, de a preparatív szerves kémiai kutatásokbeli alkalmazások Kajtár és munkatársai nevéhez fűződnek. A Kajtár-iskola mai vezető kutatói Hollósi Miklós és Perczel András akadémikusok.

Tömeg-spektrometriával hazánkban elsőként Cornides István az ELTE Kísérleti Fizikai Tanszékén az 1950-es

évek elejétől foglalkozott. A későbbi Nobel-díjas Békéssy György tanársegédjeként kezdte szakmai pályafutását. Elsősorban a műszerfejlesztésre és a mérés technikára összpontosította kutatásait, de az oktatás is igen fontos szerepet kapott tevékenységében. Nagyformátumú tudós, elhivatott és szuggesztív tanítómester, tiszteletreméltó és közszeretnek örvendő karizmatikus személyiség volt. Résztvétele és vezető szerepe az 1956-os forradalomban és szabadságharcban (az ELTE TTK-n őt választották a Forradalmi Bizottság elnökévé) kettészakította meredeken felfelé ívelő kutatói karrierjét. 1957-ben több hónapra bebörtönözték. Szabadulását követően Kazincbarcikán a Borsodi Vegyi Kombinátban műszerész-szaktanulmányként dolgozott. Pungor Ernő akadémikus közbenjárására 1966-tól a Bányászati Kutató Intézetben folytathatta kutatómunkáját nyugdíjazásáig. Összefogta, szervezte, tanította és irányította a hazai tömeg-spektroszkópus közösséget, s bár maga kémiai szerkezetkutatással nem foglalkozott, az e téren működő szakemberek szinte kivétel nélkül az ő tanítványaként ismerkedtek meg a szakterülettel. Arra is jutott ideje és energiája, hogy a Nyitrai Pedagógiai Főiskolán (a későbbi Konstantin Egyetemen) magyar nyelven fizikát és kémiát oktasson. Ezt az áldozatos munkát 1968-tól szinte haláláig, még nagybeteg is folytatta.



Cornides István

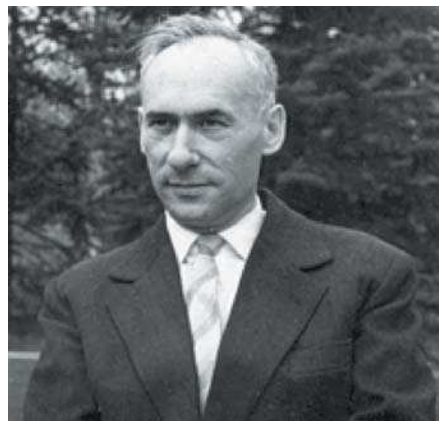
Az 1960-as évek elejétől az MTA KFKI-ban is MS-kutatások indultak. Matus Lajos és Opauszky István izotop-aránymeghatározásra, fémanalitikai célra és gázfázisú reakciók tanulmányozására alkalmazták a tömeg-spektrometriát, de, esetenként szerves vegyületek szerkezetvizsgálatára is sor került laboratóriumukban. Rendszeres szerkezetfelderítést szolgáló mérések 1963-tól az MTA KKKI Szerkezeti Kémiai Kutató Laboratóriumában Tamás József vezetésével folytak. A labor műszerépítés és mérés technika terén nélkülözhetetlen szakembere Ujszászy Kálmán volt, jelenlegi vezetője Vékey Károly, akinek érdeklődése egyre nagyobb mértékben fordult a biológiai, sőt orvosi problémák irányába.

Az MS-műszerek és mérési módszerek az elmúlt évtizedekben igen látványos fejlődésen mentek át (pl. újfajta ionizációs eljárások, MALDI, TOF, stb., kapcsolt IR-MS, NMR-MS, GC-MS, tandem-mérések). Ennek, a kis anyagigénynek és az igen széleskörű, a kémia szinte valamennyi ágát lefedő alkalmazási lehetőségeinek

köszönhetően a kémiai szerkezetkutatás NMR és IR spektroszkópia, valamint az egykristály-diffrakció mellett, negyedikként a legfontosabb, legnélkülözhetetlenebb segédeszközzé fejlődött. Érthető tehát, hogy minden fontos kémiai kutatóhely igyekezett ezt a módszert saját falai között meghonosítani. Kevesen tudják, hogy az iparban már 1960-ban sor került MS-mérésekre. Az Egyesült Izzóban Tahy Péter gázanalízisre használta a tömeg-spektrometriát. Az ipari kutatók közül elsőként, 1967-ben a MÁFKI-ban végeztek MS-méréseket. Décsy Zoltán és Prókai László együttműködés keretében a POTE karotinoid-kutatásaiba kapcsolódott be MS-mérésekkel. 1970-ben a BME Szervetlen Kémiai Technológiai és Analitikai Tanszékein, az ELTE Általános és Szervetlen Kémiai Tanszékén, továbbá a Gyógyszerkutató Intézetben indultak MS-vizsgálatok. A BME-n Szepesy László az MS-t, mint GC-detektort alkalmazta, Balla József GC-MS-méréseket kezdeményezett. Az ELTE-n Borossay József a gázanalízisben és szilícium-vegyületek szerkezetvizsgálatában alkalmazta a módszert. A GYKI-ban a Sohár Pál vezette Spektroszkópiái Munkacsoport keretében létesült MS-labor, Horváth Gyula irányításával. A KLTE 1975 körül kapcsolódott be a hazai MS-vizsgálatokba Dinya Zoltán közreműködésével, aki később az MS környezet-kémia alkalmazásainak területére koncentrált kutatásait.

Az UV-látható spektroszkópiát követően, a leggyorsabban elterjedt és a legszélesebb körben, a kémia szinte minden területén felhasználható műszeres módszer kétségtelenül az infravörös spektroszkópia. A molekulák biztonságos azonosításán kezdve (az IR spektrum átlagosan 30-50 sávból áll, ennyi független, az olvadásponttal azonos értékű jellemző adat együttesét joggal nevezzük a molekulák ujjlenyomatának), a funkciós csoportok felismerésén át, összetétel-meghatározásra, kinetikai vizsgálatokhoz, reakciómechanizmusok felderítésére, tisztaság-ellenőrzésre, s számtalan más célra alkalmasak az IR spektrumból nyerhető információk. A mérőműszer nem kimagaslóan költséges, a méréstechnika egyszerű, az üzemeltetés különleges felkészültséget, speciális műszaki feltételeket nem igényel. Nem csoda, hogy a módszer elterjedése igen gyorsan játszódott le az első IR-spektrométerek, 1957-ben megtörtént üzembe helyezését követően. Az 1960-as évek végére minden fontosabb hazai kémiai kutatóhelyet felszereltek IR-készülékekkel. Az IR-szakemberek száma jóval lassabban növekedett, mert az IR-spektrumok sikeres értelmezése igen nagy gyakorlatot, tapasztalatot és alapos elméleti felkészülést követel. Ezért tág tere nyílt az együttműködéseknek néhány hazai IR-szaktekintély és a népes felhasználói kör, a preparatív vegyészek között.

A két első IR-kutatócentrum a Varsányi György vezette BME-KKKI közös laboratóriuma és a veszprémi MÁFKI, ahol Bor György volt a kutatómunka irányítója. E két kutatóhelyen 1957-ben helyeztek üzembe egy-egy, a nyugati világban már akkor elavultnak minősülő, szovjet gyártmányú egysugaras (IKSZ-11) berendezést. Varsányi főként egyszerű benzol-származékok rezgési spektroszkópiájával, a benzol-normálrezgések hozzárendelésével, Bor György fém-karbonilok szerkezetvizsgálatával foglalkozott. Varsányi nevéhez fűződik az első hazai egyetemi IR-tárgyú speciális előadás (a BME vegyészkarán az 1956/7-es tanévtől) és a nagyszerű „alapkönyv”, több száz benzolszármazék IR-sávjainak asszignációjával.



Varsányi György

Az 1956-os szabadságharc és forradalom vérfelújítása után romokban heverő, éhező Magyarországot a „baráti” Szovjetunió gyorssegélyben részesítette, melynek keretében három, IKSZ-12 (az IKSZ-11 némileg továbbfejlesztett típusa), még mindig egysugaras készülék érkezett az országba. Ne firtassuk, hogy erre volt-e akkor a legnagyobb szükség, ám ettől eltekintve is, e műszerek tönkrement állapotban érkeztek: három legfontosabb építőelemük, a detektor (vákuum-termoelem), és az optikai erősítő két fő-része a fotocella és a torziószálas, tükrös galvanométer használhatatlan volt. A „boldog” tulajdonosok: a szegedi egyetem Fizikai-Kémiai Tanszéke, a Richter-gyár és a GYKI voltak. E sorok írója, friss diplomásként első feladatául kapta a GYKI műszerének üzemképessé tételét és működtetését. Egy kitűnő műszer-szakértő (Kliburszky Béla) segítségével, regénybeillően kalandos úton, egy évnyi megfeszített munkával sikerült „feléleszteni” a GYKI műszerét. A dolgnak híre ment, s megbíztak a másik két készülék megjavításával is. Mivel sikerült, ez vált kiinduló pontjával munkahelyen kívüli tudományos együttműködésemnek.

Az IKSZ-12-vel teljes napi munkát követelt egy használható IR-spektrum elkészítése. Szerencsére ez a korszak nagyon rövid ideig tartott: 1960-ban az ELTE Szerves Kémiai Tanszéke kapott egy Zeiss-gyártmányú, két-sugarmentes UR-10 készüléket, amelyet a Tanszéken és a GYKI-ban folyó kutatások kiszolgálására Ruff Ferenc kollegámmal működtettünk. 1962-ben a KFKI, 1964-ben a KLTE Szerves Kémiai Tanszéke jutott UR-10 készülékhez. A KFKI-ban Mink János és Szőke József végezték az IR vizsgálatokat, a KLTE Szabó Sándorra és Dinya Zoltánra bízta a műszer működtetését, akik az ELTE laborban ismerkedtek meg a műszerrel és az IR szerkezetkutatásbeli alkalmazásának tudnivalóival.

Arra nincs lehetőség, hogy tovább kövessük az IR-spektroszkópia hazai térnyerését, de, mint említettem, néhány évvel később már szinte minden jelentősebb hazai kutatóhelyen működött IR-berendezés.

Az IR-módszert tárgyalva, feltétlenül meg kell említeni az MTA külső tagjának, Sándorffy Kamillnak (1920-2006) Norman Jones-szal közös könyvfejezetét, amely 1956-ban, a Weissberger-sorozatban (*Technique of Organic Chemistry*), a IX. kötetben jelent meg (*The application of infrared and Raman spectrometry to the elucidation of molecular structure*), mint az első, a módszer szerkezetkutatásbeli

alkalmazásait tárgyaló terjedelmesebb publikációt, és az első és máig egyetlen magyar nyelvű IR-tárgyú monográfiát (*Holly Sándor és Sohár Pál: Infravörös spektroszkópia, Műszaki Kiadó, 1968*), amelyből a kezdő hazai IR-szakemberek sok éven át első ismereteiket szerezték e tudományterületről.



Sándorffy Kamill

A napjainkban vitathatatlanul legfontosabb, a kémia minden területén és valamennyi természettudományban legelterjedtebben alkalmazott nagyműszeres módszer a mágneses magrezonancia (NMR-) spektroszkópia. Amíg a többi ilyen mérés technika szokásos karrierje során a kezdeti sikereket és lelkesedést követően, amidőn a módszer alkalmazása a publikációk címében kapott helyet, hosszabb-rövidebb idő után, rutinszerű részévé vált a kutatásoknak és a mérési eredmények közlése a kísérleti részben kötelező feltétele lett a kéziratok befogadásának a nívósabb szaklapokban, addig az NMR-spektroszkópia időről-időre „újjaszületett”, mert az elméletben és a mérés technikában olyan forradalmi fejlődés ment végbe, ami az alkalmazások és a megoldható problémák szempontjából addig elképzelhetetlen új lehetőségek sokaságát nyitotta meg a kutatás számára.

Valószínűleg kevesen tudnak arról, hogy még az első sikeres rezonancia-kísérleteket megelőzően Simonyi Károly munkatársaival a BME Bay Zoltán vezette Fizikai Intézetében atomsugarakkal atommagok giromágneses faktorának mérésével foglalkozott, egy időben a hasonló amerikai kísérletekkel. Ezek a kísérletek előkészítői, úttörői voltak az NMR-spektroszkópiának, s méltán lehetünk büszkéek arra, hogy közöttük voltak a hazánkban folyó kutatások is. A háború megtörte a kezdeti lendületet, s évekre megszakadtak a sikeresnek induló munkák.

Előbb az ELTE Fizikai Intézetében, később, oda áttelepülve, a Központi Fizikai Kutatóintézetében munkatársaival, Faragó Péterrel, E. Gécs Máriával és Mertz Jánossal Bay Zoltán kezdeményezte, illetve folytatta az NMR-kutatásokat. Házilag barkácsolt szélessávú műszerekkel, szilárdtest-fizikai problémákkal foglalkoztak. A műszerépítésben is résztvevő Tompa Kálmán vezetésével különböző fémekben és ötvözetekben a töltéssűrűség-oszcillációt tanulmányozták. Kommersz készülékhez csak évtizedek múltán (1973-ban) jutottak. Kutatómunkájuk relaxációs idők meghatározására, illetve szövetminták in vitro mérésére összpontosult.

A KFKI-s csoport, bár kémiai problémák vizsgálatával nem foglalkoztak (ezt nem is tették lehetővé mérőberendezéseik), konferencia- és ismeretterjesztő eladásokkal és oktatási tevékenységükkel szállás-csinálói voltak, a hazai NMR-spektroszkópiának. A hazai kémikusok előszóban először 1963-ban, a szegedi vegyészkonferencián hallhattak az NMR-módszer kémiai szerkezetkutatásbeli alkalmazásáról. A kanadai tanulmányútjáról akkor hazatért Fodor Gábor számolt be új vegyületek szerkezet-felderítéséről NMR vizsgálatokkal.

Hazánkban, több, mint egy évtizedes késéssel, 1964-ben nyílt lehetőség NMR-mérésekre a kémikus kutatók munkájának segítésére. Ekkor helyeztek üzembe egy 60 MHz-es AEI-gyártmányú készüléket a KKKI-ban, amelyen Neszmélyi András és Radics Lajos dolgoztak. Elsősorban az intézetükben felmerült problémák tisztázásában működtek közre, de az egy ideig egyetlen hazai nagyfelbontású készülék működtetőiként monopol-helyzetükből adódóan sok hazai kutatóhellyel alakítottak ki együttműködést. Ezért a legkülönbözőbb kémiai problémák vizsgálatában, és igen sokféle vegyületfajta tanulmányozásában vettek részt. Kulcsszerepük volt a módszer hazai megismertetésében és elterjedésében. Kezdeti tudományos eredményeik közül kiemelendő a gátolt rotáció és a nitrogén-heterociklusok kvaternerezési reakcióinak sztereokémiai tanulmányozása. Radics más kutatóhelyeken szakértőként, a Varian-cégnél szoftver-fejlesztőként is tevékenykedett, Neszmélyi a 70-es évektől a természetes anyagok és szénhidrátok vizsgálatára és a ^{13}C NMR spektroszkópiára, illetve a pulzustechnikák hazai bevezetésére összpontosított.

A gyógyszeriparban, közelebről a Gyógyszerkutató Intézetben Sohár Pál vezetésével 1966-ban indultak NMR-kutatások. Egy korszerűtlen, gyenge teljesítményű 60 MHz-es műszert (JEOL C-60) 1972-ben sikerült felcserélni egy lényegesen jobb teljesítményű (JEOL 60-HL), majd pedig egy ugyancsak 60 MHz-es, de korszerű és speciális kiegészítő vizsgálatokra (multinukleáris-, DR- és VT-mérés, számítógépes spektrumakkumuláció) is alkalmas Varian berendezésre. Az NMR-munkacsoport széleskörű hazai és nemzetközi együttműködéseket alakított ki és mintegy iskolaként is működött. Számos kiváló NMR-s szakember (így pl. Tóth Gábor, Mányai György, Méhesfalviné Vajna Zsuzsa, Pelczer István, Sótiné Tolvaj Márta, Kövesdi István, Pólos Katalin, Dvortschák Péter) pályafutása indult innen és több tucat hazai és külföldi vendégkutató, közöttük több kiváló szakteknitely, ismerkedet meg az NMR-spektroszkópiával a munkacsoportban. Sohár Pál a szerzője az első magyar NMR-monográfiának (Akadémiai Kiadó, 1976 és CRC Press, 1983-84) és ugyancsak nevéhez fűződik az első magyarországi egyetemi NMR-kurzus, amelyet az ELTE kémiai Intézetében, illetve kezdetben az 1969/1970-es tanévtől a Szerves Kémiai Tanszéken, négy évtizeden át, két féléves speciális kollégiumként adott, illetve ad elő.

Az 1964-1970-es évek a 60 MHz-es műszerek korszakát jelentik Magyarországon. A KKKI-t és a GYKI-t követően, 1968-ban a BME Szerves Kémiai Tanszékén helyeznek üzembe egy Perkin-Elmer R-12 berendezést, amelyen Kolonits Pál dolgozik. Az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén 1970-től ZEISS gyártmányú 60 MHz-es készülékkel végez méréseket Mezey Pál, Ósapayné Balogh Klára és Kövesdi István. 1971-től a POTE és a MÁFKI csatlakozik a 60

MHz-es készülék-tulajdonosokhoz. Pécssett Aradi Ferenc és Földesi András az első NMR-szakemberek, a MÁFKI-nál Szalontay Gábor, aki a Veszprémi Egyetem számára is végez méréseket. Az egyetemek közül utolsóként a SZOTE helyez üzembe egy JEOL 60 MHz-es spektrométert 1973-ban, s itt Dombi György az NMR-specialista. A nagy gyógyszergyárak is felismerik az NMR jelentőségét és sorra saját mérőeszközökről gondoskodnak. A Chinoin már 1970-ben üzembe állít egy 60 MHz-es Perkin-Elmer készüléket, s ezen Dvortschák Péter, később Podányi Benjámint dolgozik. A Richter 1964-ben csatlakozik a 60 MHz-esek táborához, s a Varian berendezésnek itt ifj. Szántay Csaba a gazdája. Az EGYT 1976-ban helyez üzembe egy Perkin-Elmer Hitachi műszert, amellyel elsőként Kis-Tamásné Kovács Ágnes végzi a méréseket.

Az 1970-es évtized a 100 MHz-es, elektromágnessel működő Fourier-transzformációs berendezések korszaka. Az első, JEOL-gyártmányú ilyen készüléket a Debreceni Egyetem (akkor KLTE) Szerves Kémiai Tanszéke kapta és Szilágyi László működtette. Hozzá a 80-as évek elején csatlakozott E. Kövér Katalin és Batta Gyula. Az NMR-labor regionális igényeket is ellátott és igen hamar behozta a kezdeti lemaradást: rövid idő alatt a legjelentősebb hazai NMR-kutatóhelyek közé emelkedett. A rezonancia-módszerek oktatása a 70-es évek közepétől folyik Debrecenben és fontos szerepet játszik a graduális és posztgraduális képzésben. Kutatásaik középpontjában a szénhidrátok, antibiotikumok és peptidok szerkezet-felderítése, illetve molekuladinamikai tanulmányozása áll, de metodikai munkáik, így a heteronukleáris NOE-, a szelektív és nem szelektív, egy- és két-dimenziós pulzus-szekvenciákat alkalmazó mérési technikák fejlesztése is nemzetközi elismerést vívott ki.

A KKKI 1973-ban, a GyKI 1976-ban jutott Varian gyártmányú FT-berendezéshez. Ez mindkét intézményben a rutin-szerű hozzáférést tett lehetővé a ^{13}C NMR mérésekhez, jelentősen bővítve ezzel a megoldható szerkezetkutatási problémák körét. Lehetővé vált nukleotidok, bonyolultabb antibiotikumok és peptidok vizsgálata is, amelyeket a KKKI-ban az időközben Peredyné Kajtár Máriával és Baitzné Gács Eszterrel, később Sándor Péterrel kibővült NMR-csoport, számos értékes publikációt eredményezve végzett. A BME Analitikai Tanszékén 1978-ban helyeztek üzembe egy JEOL 100 MHz-es készüléket, amely a labort vezető Tóth Gábor számára kutatásainak sikeres kiterjesztését tette lehetővé, többek között ^{15}N NMR- vizsgálatokra.

Az 1980-as évek elején megjelentek Hazánkban is a nagyterű, szupravezető mágnessel működő számítógép-vezérelt csúcsműszerek. Elsőként, 1981-ben, mindössze néhány óras eltéréssel Debrecenben, a KLTE-n kezdett működni egy 200 MHz-es, s az EGIS-ben egy 250 MHz-es Bruker spektrométer. Néhány évet várni kellett a következő nagyterű berendezés üzembeállítására. Egészen 1985-ig, amikor a KKKI szerzett be egy Varian 400 MHz-es készüléket. Ezután ismét nagyobb szünet következett, amíg 1991-ben a veszprémi, 1992-ben pedig a szegedi egyetemen installáltak egy-egy 300, illetve 400 MHz-es berendezést, majd 1995-ben a FEFA-III pályázattal elnyert támogatással az első hazai 500 MHz-es spektrométert az ELTE Kémiai Tanszékcsoportjánál. Ettől kezdve sűrűsödtek a hazai csúcsműszer-beszerzések és mára minden jelentősebb kémiai kutatóhely fel van szerelve nagyterű NMR-készülékkel. Ezek pusztán felsorolása is ésszerűtlenül megnövelné e rövid összefoglalást a műszeres módszerek elterjedéséről és térhódításáról Magyarországon.

Itt kell minden kollegámtól elnézést kérem, akik kutatási eredményei, esetleg maga az általuk művelt mérési módszer is, kimaradt ebből a rövid áttekintésből, de valamiképpen keretek közé kellett szorítani a roppant szerteágazó témát és józan határok közé a terjedelmet.

Azért remélem, hogy a legfontosabb idevágó tudnivalókból nem maradt ki semmi.

Az NMR spektroszkópia mára nélkülözhetelenné és mindennapos rutin-műszerré vált nemcsak a kémiában, de a biológiában (gondoljunk csak a biopolimerek, peptidok, enzimek szerkezet-felderítésére) és az orvostudományban, sőt az orvosi diagnosztikában is (MRI), s ha nem is tartunk ott, mint pl. Japán, ahol az ipari minőségbiztosítást több-tucat NMR műszernek otthont adó, városrésznyi óriás-laborok szolgálják ki, az a tragikus műszerezettségbeli lemaradás, ami a hazai kémiai szerkezetkutatást sok évtizeden át sújtotta, jelentősen mérséklődött.

A műszeres módszerek elterjedése és mindennaposává válása a mérési eredmények félreértelmezésének, s így a molekulaszervezeteket illető tévedések veszélyét jelentősen csökkentette. A spektroszkópus, az egyes mérés-technikákra specializálódott szakemberek munkája egyre biztonságosabbá (s amit, némi nosztalgiával kell hozzáfűzni ehhez: ezzel kevesebb elméleti tudást és tapasztalatot igénylővé) vált, s egyre valószínűtlenebb, hogy tévedése nyomán – Dogovics Tituszként – magával rántsza szintetikus partnerét a hibás szerkezetek szakadékába.

A 100 éves röntgendiffrakció a gyógyszerkutatásban

BOMBICZ Petra* és KÁLMÁN Alajos

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet: Pustaszeri út 59-67., 1025 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A klasszikus kristálytan után a modern krisztallográfia születését az 1912-ben Laue, Friedrich és Knipping által elvégzett első röntgendiffrakciós kísérlethez kötik. Az anyag szerkezetének atomi felbontású megismerése a tudománytörténet egyik legfontosabb felfedezése, mely forradalmasította a természettudományok minden ágát: fizikát, kémiát, biológiát, föld- és anyagtudományokat¹. Az anyag fizikai-kémiai, makroszkópikus tulajdonságának megértéséhez ismernünk kell a szerkezeti felépítését. 100 év elteltével a krisztallográfia még mindig a tudomány élvonalában van². Az ENSZ döntése értelmében 2014 a krisztallográfia éve lesz.

A cikkben a centenáriumi megemlékezés után példákat láthatunk a röntgendiffrakció gyógyszerkutatásban való alkalmazására elsősorban a kiralitás szerepéről és a polimorfia jelenségéről. Ez magában foglalja a szerkezet és tulajdonság összefüggéseit, a teljes és parciális izostrukturalitás témakörét, a másodlagos kölcsönhatások szerepét, kokristályok vizsgálatát és a kristályhabitus befolyásolását a szerkezet ismeretében.

2. A röntgendiffrakció száz éve

100 éve, 1912. március végén hajtotta végre Max von Laue, Walter Friedrich és Paul Knipping az első röntgendiffrakciós kísérletet. Az, hogy atomi szinten láthatóvá vált az anyagok szerkezete, forradalmi változást hozott a természettudományban, valamint új tudományágak születtek. A röntgendiffrakció módszerével vizsgálhatunk ásványokat, ionos szerkezeteket, szerves és szervetlen vegyületeket, fehérjéket és vírusokat. Miért éppen a röntgensugárzás tette ezt lehetővé? A röntgensugárzás egy viszonylag könnyen előállítható rövid hullámhosszú elektromágneses sugárzás, melynek hullámhossza összemérhető az atomi távolságokkal. Laboratóriumi méretekben hagyományos röntgensövet, forgóanódos röntgensövet, vagy az elmúlt években kifejlesztett mikroforrásokat használhatunk. Ezek alkalmazásával mára a röntgendiffrakció egyre inkább rutin módszerre válik. Nagyobb intenzitású és hullámhosszban hangolható röntgensugárzást kapunk szinkrotron forrásnál, melyben a relativisztikus sebességre gyorsított töltött részecskék által kibocsátott röntgensugárzást alkalmazzuk. A diffrakciós módszerek között kell megemlítenünk a neutrondiffrakció módszerét is. Míg a röntgensugarak az elektronfelhőn, addig a neutronok az atommagokon szóródnak, így pontos atomi hely meghatározást tesznek lehetővé még a hidrogén atom esetében is. Hátrány, hogy a kisebb intenzitású sugárzás miatt nagyobb kristályra van szükség, és a mérési idő is hosszabb, heteket vesz igénybe az atomreaktornál. A nagyműszer igény miatt a két utóbbi módszer még nem tekinthető rutin eljárásnak.

* Tel.: 1-438-4141 / 201; e-mail: bombicz.petra@ttk.mta.hu.

Röntgendiffrakcióval vizsgálhatunk porokat és egykristályokat. Pordiffrakció esetén elveszik az az információ, hogy a kristály melyik síkjáról származik az adott reflexió. Ezért szerkezetmeghatározás céljára az egykristálydiffrakció terjedt el. Azonban az egykristály röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározás szűk keresztmetszete éppen az egykristály előállítása. Ha ez nem sikerül, a pordiffrakció módszeréhez fordulunk. A pordiffrakciót elterjedten alkalmazzák analitikai célokra, fázis és cella meghatározásra. Azonban kisebb vegyületek vagy nagyobb szimmetriával bíró molekulák szerkezete nagyfelbontású mérésből már meghatározható. A röntgendiffrakciós módszer előnye a kis anyagigény, 1-2 mg anyagból 1-2 ml oldószerrel már lehet kristályt növesztetni.

Az egykristály röntgendiffrakció alkalmas a molekula- és kristályszerkezet megismerésére. Megtudjuk, milyen a molekula kompozíciója, konstitúciója, konformációja és konfigurációja. A kristályszerkezetből megismerjük, hogyan épül fel a kristály molekulákból vagy ionokból, hogyan illeszkednek a szimmetriák által egymáshoz rendelt egységek és milyen intermolekuláris kölcsönhatások vannak a molekulák között. Mindezek célja, hogy kapcsolatot találjunk a szerkezet és a kristály fizikai és kémiai tulajdonságai között. Ennek megismerésével lehetővé válik megkívánt fizikai-kémiai tulajdonságú anyagok előállítása.

A krisztallográfia jelentőségét mutatja a krisztallográfiai munkákért odaítélt Nobel-díjak (1. táblázat). Néhányat kiemelve:

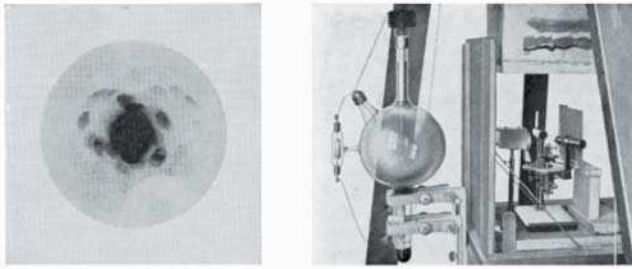
Az első Nobel-díjat Wilhelm Conrad Röntgen kapta 1901-ben a róla elnevezett sugárzás felfedezéséért. 1914-ben kapta Max von Laue a kitüntetést az első diffrakciós kísérlet elvégzéséért. Rá egy évre, 1915-ben William Henry és William Lawrence Bragg, apa és fia, kapta a Nobel-díjat az első szerkezetek megoldásáért. 1962-ben Max F. Perutz és John C. Kendrew munkáját a globuláris fehérjék kutatásáért kémiai Nobel-díjjal jutalmazták, míg Francis C. Crick, James D. Watson és Maurice Wilkins fiziológiai Nobel-díjat kapott a DNS helikális szerkezetének felismeréséért. 1964-ben Dorothy C. Hodgkint biológiailag fontos molekulák szerkezetmeghatározásáért jutalmazták, mint pl. a B₁₂ vitamin és a penicillinek. 1985-ben Herbert Hauptman és Jerome Karle kapta a krisztallográfiai fázisprobléma ún. direkt módszerrel történő megoldásáért a kitüntetést. Itt kell megemlítenünk, hogy Oszlányi Gábor és Sütő András charge flipping módszere, melyet 2005-ben publikáltak, egyre szélesebb körben kerül felhasználásra, nem utolsósorban problémás szerkezetek meghatározására. 2009-ben Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz és Ada E. Yonath riboszóma kutatásait jutalmazták. A tavalyi kémiai Nobel-díjat Daniel Shechtman kapta a kvázikristályok felfedezéséért.

1. Táblázat. A kriszallográfiához kötődő Nobel-díjak.

2012 Kémiai	R. J. Lefkowitz és B. K. Kobilka	<i>G-protein-kapcsolt receptorok felfedezéséért és működésük leírásáért</i>
2011 Kémiai	D. Shechtman	<i>Kvázikristályok felfedezéséért</i>
2010 Fizikai	A. Geim és K. Novoselov	<i>A grafént felfedező kísérletekért</i>
2009 Kémiai	V. Ramakrishnan, T. A. Steitz és A. E. Yonath	<i>Riboszómák szerkezetének és szerepének tanulmányozásáért</i>
2006 Kémiai	R. D. Kornberg	<i>Az eukarióta sejtekben zajló DNS-transzkripció molekuláris alapjainak kutatásáért</i>
2003 Kémiai	R. MacKinnon	<i>Kálium csatornák felépítésének és működésének tanulmányozásáért</i>
1997 Kémiai	P. D. Boyer, J. E. Walker és J. C. Skou	<i>Az ATP-szintetáz enzimmel katalizált ATP-szintézis vizsgálatáért</i>
1996 Kémiai	R. Curl, H. Kroto és R. Smalley	<i>Fullerének felfedezéséért</i>
1994 Fizikai	C. Shull és N. Brockhouse	<i>A neutron diffrakció felfedezéséért</i>
1992 Fizikai	G. Charpak	<i>A sokszálas proporcionális kamra kifejlesztéséért</i>
1991 Fizikai	P.-G. de Gennes	<i>A rendezettségi jelenségek tanulmányozásáért, melyet általánosítva folyadékkristályok és polimerek tanulmányozására is használni lehet</i>
1988 Kémiai	J. Deisenhofer, R. Huber és H. Michel	<i>A fotoszintetikus reakció központ 3 dimenziós felépítésének meghatározásáért</i>
1985 Kémiai	H. Hauptman és J. Karle	<i>A kristályszerkezet meghatározáshoz használt direkt módszerek kifejlesztéséért</i>
1982 Kémiai	A. Klug	<i>A kriszallográfiai elektronmikroszkópia kifejlesztéséért és a biológiailag fontos nukleinsavfehérje-komplexek szerkezetének kutatásáért</i>
1976 Kémiai	W. N. Lipscomb	<i>A boránok szerkezetének kutatásáért</i>
1972 Kémiai	C. B. Anfinsen	<i>A ribonukleázok terén végzett kutatásaiért</i>
1964 Kémiai	D. Hodgkin	<i>Biokémiai anyagok szerkezetének kriszallográfiával történi vizsgálatáért, pl. B₁₂ vitamin</i>
1962 Orvosi	F. Crick, J. Watson és M. Wilkins	<i>DNS helikális szerkezetének felismeréséért</i>
1962 Kémiai	J. C. Kendrew és M. Perutz	<i>Globuláris fehérjék kutatásában elért eredményeikért</i>
1954 Kémiai	L. C. Pauling	<i>A kémiai kötés természetének kutatásáért, és a komplex vegyületek szerkezetmeghatározásában történő felhasználásáért</i>
1946 Kémiai	J. B. Sumner	<i>A felfedezéséért, hogy az enzimek kristályosíthatók</i>
1937 Fizikai	C. J. Davison és G. Thompson	<i>Az elektronok kristályokon történő diffrakciójának felfedezéséért</i>
1936 Kémiai	P. J. W. Debye	<i>A molekulászerkezet vizsgálatáért a dipólusmomentum és gázokban lejátszódó röntgendiffrakció és elektrondiffrakció segítségével</i>
1929 Fizikai	L.-V. de Broglie	<i>Az elektron hullámtermészetének felfedezéséért</i>
1917 Fizikai	C. G. Barkla	<i>Az elemek karakterisztikus röntgensugárzásának felfedezéséért</i>
1915 Fizikai	W. H. Bragg és W. L. Bragg	<i>A kristályszerkezet röntgensugárással történő vizsgálatával kapcsolatos szolgálataiért</i>
1914 Fizikai	M. Von Laue	<i>A röntgensugárzás kristályokon történő diffrakciójának felfedezéséért</i>
1901 Fizikai	W. C. Röntgen	<i>A röntgensugárzás felfedezéséért</i>

A kriszallográfia azonban sokkal távolabbi múltra tekint vissza. 1669-ben ismerte fel Steno a lapszögek állandóságának törvényét, mely szerint a kristálylapok ill. a síknormálisok által bezárt szögek a kristály habitusától függetlenül azonos hőfokon és nyomáson állandók. 1781-ben publikálta Haüy abbé morfológiai vizsgálatait, a kristályok mechanikai, hőtani, optikai, elektromos tulajdonságairól. Felismerte, hogy a kristályok anizotróp hasadása során keletkező paralelepipedonok megőrzik a kiindulási kristály tulajdonságait. 1895-ben fedezte fel Röntgen az „X-sugárzást”. A röntgensugár abszorpción alapuló orvosi felhasználása gyorsan, széles körben elterjedt. Az első diffrakciós kísérlet 1912-ben egyidejűleg igazolta a sugárzás elektromágneses hullámtermészetét, és az anyag atomi rácsszerkezetét (1. ábra). Egy évre rá 1913-ban oldották

meg Braggék az első egyszerűbb kristályszerkezeteket. Ők dolgozták ki az ún. Bragg egyenletet ($n\lambda = 2d\sin\theta$), mely a diffrakció jelenségének zseniális, de bizonyos szempontból túlegyszerűsített leírása. A második világháború után robbanásszerű fejlődés következett be az egykristálydiffrakció területén az egyre gyorsabb számítógépek és az automatizált diffraktométereknek köszönhetően. A szerves kémiai kriszallográfia születését 1961-re, Kitajgorodszkij a témából kiadott könyvének³ megjelenésére datálják. Az 1970-es években a szerkezetek meghatározása - mérés és számítások - még hónapokat, éveket vett igénybe. Az 1980-as és az 1990-es években még hetekig tartott a szerkezetmeghatározás. Az 1990-es évek végén a térdetektorok megjelenésével és a gyors számítógépek alkalmazásával néhány órára, egy napra csökkent ez az idő.

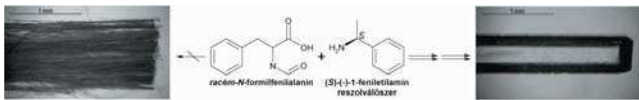


1. Ábra. Laue, Friedrich és Knipping által készített első diffrakciós felvétel rézgálic kristályról. A készülék fényképe.

3. Röntgendiffrakciós szerkezet meghatározás és kiralitás

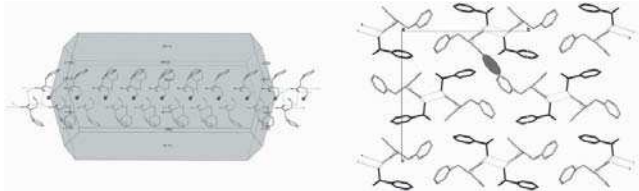
A nagy érzékenységu - szcintillációs, ccd és image plate - detektorok megjelenésével bebizonyosodott, hogy a Friedel törvény nem érvényes és lehetővé vált az oxigén vagy annál nagyobb rendszámú elemek anomális diszperziójának mérése, és ezáltal az abszolút konfiguráció meghatározása.

Enantiomerek elválasztásának egyik módszere a diasztereomer sóképzéssel végzett resolválás, melyben a racém vegyülettel rokon szerkezetű resolválószert alkalmaznak. Az *N*-formilfenilalanin (*S*)-1-feniletilamminnal történő resolválása során⁴ a királis megkülönböztetés a diasztereomer asszociátumok közötti stabilitás különbségen alapul (2. ábra). Ez a másodlagos kölcsönhatások eltérő térbeli elrendeződésére vezethető vissza.



2. Ábra. Diasztereomer sóképzéssel történő enantiomer elválasztás. Az (*S,R*) konfigurációjú nagyobb oldhatóságú diasztereomernél a kristálynövekedés radiális irányban gátolt, tús kristályok kötege keletkezik. Az (*S,S*) konfigurációjú kisebb oldhatóságú diasztereomer gyorsabban kristályosodik, és szép egykristály növekszik.

Az elválasztási eljárásban kinetikus kontroll érvényesül. A diasztereomer agglomerátum az erős másodlagos kölcsönhatásoknak köszönhetően gyorsan növekszik a kétfogású csavartengely irányában (3. ábra).

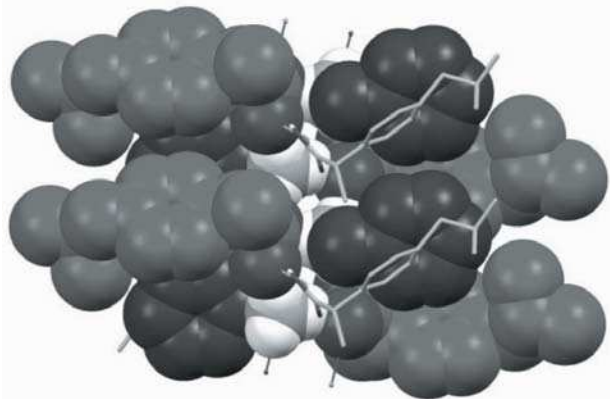


3. Ábra. Az (*S*)-(-)-1-feniletilammónium-(*S*)-(+)-*N*-formilfenil-alaninát só kristálya ($P2_12_12_1$): a kétfogású csavartengely iránya a.) a lap síkjában és b.) arra merőlegesen helyezkedik el.

Az oszlopon belül található az erős másodlagos kötésrendszer, míg kifelé állnak a molekula apoláros részei. Az (*S,S*) konfiguráció esetén az *N*-formilfenilalanin kettőskötésű oxigénje kifelé fordul az oszlop irányából, így lehetőség nyílik az oszlopok között egy gyenge, de jelenléte miatt lényeges C-H...O típusú hidrogénkötés kialakítására, mely elősegíti a kristálynövekedést radiális irányban. Az

(*S,R*) konfiguráció esetén az *N*-formilfenilalanin eltérő térbeli elrendeződése miatt a kettőskötésű oxigén nem fordul kifelé az oszlop irányából, másodlagos kölcsönhatás kialakulásának nincs meg a feltétele, a hidrofób oszlopok elrendeződése nehézkes, a kristálynövekedés radiális irányban gátolt.

Az ibuprofén (2-(4-izobutilfenil)-propionsav) egy nem-steroid gyulladáscsökkentő, fájdalom- és lázcsillapító hatású szer. Királis és akirális additívok hatását vizsgálták⁵ racém ibuprofén szétválasztására szuperkritikus extrakcióval. A (+)-(*R*)-feniletilamminnal történő resolválás során mind a (+)-(*R*)-feniletilamin(-)-(*R*)-(2-(4-izobutilfenil)-propionát és a (+)-(*R*)-feniletilamin(+)-(*S*)-(2-(4-izobutilfenil)-propionát hasonló felépítésű kristályt ad ($P2_12_12_1$). A kation és az anion aránya 1:1, a kétfogású csavartengely mentén elhelyezkedő molekulák oszlopokba rendeződnek, melyekben a másodlagos kötőerők rendszere azonos, akár az *R*, akár az *S* ibuprofén alkotja. Amennyiben a királis (+)-(*R*)-feniletilamin helyett a szerkezetileg rokon, de akirális benzilamint alkalmazunk, a keletkező racém termékben (*P*-1) az ibuprofén és a benzilamin sztöchiometriai aránya 2:1, egyaránt a szuperkritikus extrakcióval történő elválasztás eredményeként és az oldószerből növesztett egykristályban is. Az egykristály röntgendiffrakció módszerével sikerült bizonyítani, hogy a nem várt sztöchiometriai arány úgy alakul ki, hogy a keletkező só oszlopához két oldalról még egy-egy semleges ibuprofén kapcsolódik a kristályrácsban (4. ábra). Azaz egy ko-kristályon belül az ibuprofén semleges és ionos formája is megtalálható.



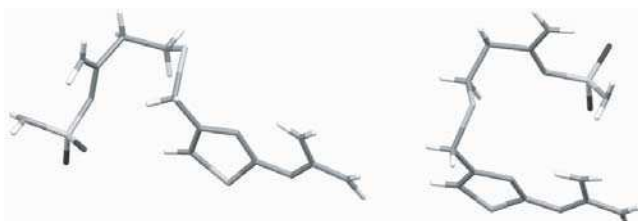
4. Ábra. A benzilamin-(2-(4-izobutilfenil)-propionát) és (2-(4-izobutilfenil)-propionsavból álló kokristály szerkezete. A semleges ibuprofént vonalas rajz mutatja, az anionos formát világosszürke térkitöltős modell ábrázolja.

4. Röntgendiffrakciós szerkezet meghatározás és polimorfia

A polimorfia jelensége és a molekula konformáció szorosan összefüggnek. A kristályban ható erők gyakran elegendően nagyok, hogy flexibilis molekulák intramolekuláris torziós szögeit befolyásolják, amely kiemeli a másodlagos gyenge kölcsönhatások szerepének fontosságát.

A cimetidint felváltó, annál 30-szor hatékonyabb famotidin polimorfia vizsgálatai a szer kifejlesztésétől napjainkig tartanak. A famotidin egy hisztamin H_2 -receptor antagonist, a gyomorsav termelést gátolja. 1981-ben hozta forgalomba

a japán Yamanouchi gyógyszergyár. Generikumát 2001-től gyártja a Richter Gedeon NyRT. A japán kutatók csak a nyitott *transz* konformációjú famotidin szerkezetét írták le. Magyar kutatók pár évvel később előállították és meghatározták a *cisz* forma szerkezetét⁶ (5. ábra) Az, hogy melyik forma kristályosodik, függ többek között a kiindulási koncentrációtól, az oldószertől, a hűtési sebességtől, a nukleációs hőmérséklettől és a beoltástól⁷. A 'B' formában található, alacsonyabb olvadáspontú, hajtű alakú *cisz* konformációjú metastabil termék a kinetikailag kedvezőbb. A nyitott *transz* konformációjú 'A' forma a termodinamikailag stabilabb⁸. Az 'A' formában lévő molekula nagyobb belső energiájú összehasonlítva az izolált monomer alacsonyabb belső energiájával, bár konformációjuk hasonló. A nagyobb belső energiát kompenzálják a kedvezőbb elektrosztatikus és polarizációs kölcsönhatási energiák, a nagyobb intermolekuláris kölcsönhatási energia.



5. Ábra. A famotidin monotróp polimorfija. A famotidin két konformere: 'A' *transz* és 'B' *cisz* forma.

Szerkezeti szempontból érdekes esetek az eltűnő polimorfok, amikor a stabilabb forma megjelenése után a kevésbé stabil módosulat többet nem állítható elő. Ez azért zavaró, mert elveszítjük a kontrollt a megfelelő forma előállításának folyamata felett, sokkal kifinomultabb technikákat kell alkalmazni a megkívánt polimorf előállítására.

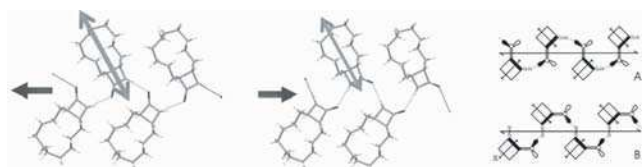
Az 1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -D-ribofuranóz molekula esete klasszikus példája az eltűnő polimorfoknak. 1947-ben állították elő először. A rákövetkező években három kontinensen, Európában, Amerikában és Ausztráliában számoltak be arról, hogy ahol feltűnt a stabilabb módosulat, ott átalakult az instabil módosulat a stabilabbá, és többet nem tudták az instabilis formát előállítani (6. ábra). Magyarországon sikerült 1981-ben az instabilis módosulatot újra előállítani⁹. A szobahőmérsékletű röntgendiffrakciós mérés során tűnt fel, hogy rövid, taszító intermolekuláris kölcsönhatás valószínűsíthető a szerkezetben. Ezért előbb alacsony hőmérsékletű (110K) röntgendiffrakciós mérést, majd 25 K-en neutrondiffrakciós mérést végeztünk a pontos hidrogén atomi pozíciók meghatározására¹⁰. A hűtés során fázisátalakulás nem következett be. Az instabilis formában rövid, 1,949(7) Å-ös hidrogén-hidrogén intermolekuláris távolságot találtunk a gyűrű hidrogének között (6. ábra), mely a stabilis formában nincs jelen. Ez a szerves kristályokban valaha talált legrövidebb intermolekuláris távolság mind a mai napig. A számolt intramolekuláris potenciális energia alapján az instabilis kristálmódosulatban megtalálható stabilabb geometriájú molekula a kisebb molekula térfogatú, mely egy nagyobb sűrűségű kristályrácsban szorosabban illeszkedve kristályosodik. Ennek ellenére mégis ez lesz az instabilis módosulat, a kristályban jelenlévő taszító intermolekuláris hidrogén-hidrogén kölcsönhatás miatt.

A β -laktám gyűrű számos antibiotikum család központi magjának része (pl. penicillin), a baktériumok sejtfal



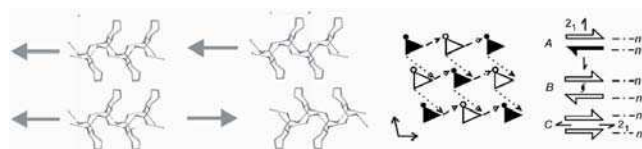
6. Ábra. Konformáció, intermolekuláris távolságok és kölcsönhatások, polimorfia: az 1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -D-ribofuranóz módosulatai. A két módosulat konformációja. a.) A: instabil (világos szürke) monoklin, $P2_1$; B: stabil (sötét szürke) rombos, $P2_12_1$. b.) A taszító H...H intermolekuláris kölcsönhatás az instabil formában.

bioszintézisének gátlásával hatnak. A *transz*-13-azabicyclo [10.2.0]tetradekán-14-on két polimorfja ismert¹¹ (7. ábra). Mindkét forma ugyanabban a tércsoportban kristályosodik, és cella paramétereik nagyon hasonlóak. Ennek ellenére nem izostrukturálisak, a két formában a hidrogénkötések iránya a homokirális láncokban eltérő. Ennek oka, hogy a molekula egy nem-kristallográfiai kétfogású tengely körül elfordul: a makrociklus konformációja közel azonos marad, azonban a nitrogén és az oxigén kvázi helyet cserél a β -laktám gyűrű átfordulásával, a másodlagos kötések elrendeződése a kétfogású csavartengelyhez képest átalakul. A metanolból kristályosított I-es formában az N-C=O...N' intermolekuláris torziós szög antiperiplanáris, míg az acetontól kristályosított II formában szünperiplanáris.



7. Ábra. A *transz*-13-azabicyclo[10.2.0]tetradekán-14-on két polimorfja: az I forma, a II forma és a kétfajta kristálybeli elrendeződés sematikus ábrázolása. A hidrogénkötések irányát nyíl mutatja.

Dipólus indukálta polimorfjára példa a *transz*-2-hidroxicikloheptánkarboxilsav esete¹². A két formában (8. ábra) a kristályszimmetriák egyformák, azzal a különbséggel az elrendeződésükben, hogy a b és c tengely megcserélődik ($Pna2_1$ és $Pn2_1a$). A cellaparaméterek

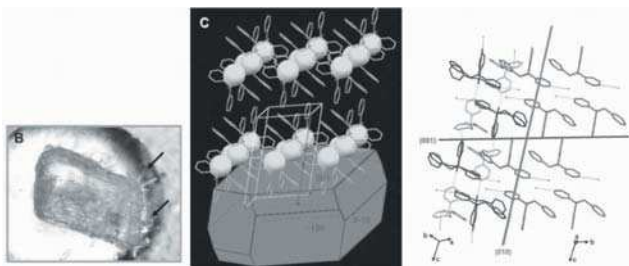


8. Ábra. A *transz*-2-hidroxicikloheptánkarboxilsav két polimorfja: az I forma, a II forma és a heterokirális rétegek lehetséges illeszkedési mintázatainak sematikus ábrázolása.

a mérési hibán belül azonosak. A különbség a szerkezetek között a molekuláris rétegek elrendeződésében van. Mindkét formában az ábrán felül bemutatott rétegben az O-H...O kötés iránya jobbról balra halad. Ehhez képest a következő réteg paralell elrendeződésű a dibutil-éter és n-hexán keverékből kristályosított I forma gyengébb minőségű egykristálya esetén, melynek szerkezetét

nehezebb volt megoldani, és kevésbé finomodott. A bután-2-on és n-hexán keverékből kristályosodott II formában az elsőt követő következő réteg antiparallel elrendeződésű. A dipólusok közvetlenül kioltódnak, a kristály jó minőségű, jól finomodik. Az I forma kristályára is teljesül a dipólus momentumok egyensúlya a teljes rács szintjén. Parallel elrendeződésű domének váltogatják egymást, a domének határán a II formának megfelelő antiparallel elrendeződés alakul ki.

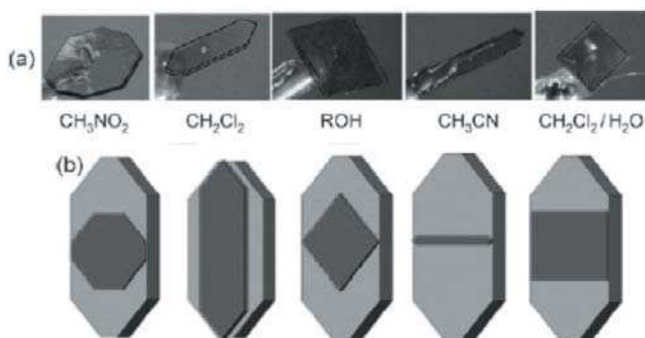
Minden szerkezet meghatározás célja, hogy kapcsolatot találjunk a szerkezet és a fizikai-kémiai tulajdonságok között. Erre jó példa a 4-(1-hidroxi-1,2-difeniletill)piridin sósavas sójának szublimációja¹³. A fűthető tárgyasztalú mikroszkópon a só szublimál, a szublimátum egykristály formájában az anyakristály bizonyos lapjain válik ki (9. ábra). A kiindulási és a szublimációval nyert egykristályokat megvizsgálva megállapítható volt, hogy a hidroklorid só a hő hatására elbomlik, tiszta 4-(1-hidroxi-1,2-difeniletill)piridin keletkezik. A só és a szerves molekula egykristálya parciálisan izostrukturális. A szublimátum az anyakristály azon lapjaira válik ki, ahol ez a részleges izostrukturalitás megvalósul, a kristályokban a piridinszármazék szerkezete a leginkább hasonló.



9. Ábra. A 4-(1-hidroxi-1,2-difeniletill)piridin HCl sójának szublimációja. A szublimátum, mely csak a szerves vegyületet tartalmazza, az anyakristály azon lapjaira válik ki, melyekkel parciális izostrukturalitást mutat.

5. Röntgendiffrakciós szerkezet meghatározás és kristály morfológia

A megkívánt gyógyszerhatóanyag birtokában a röntgendiffrakció a formuláláshoz is nyújthat segítséget a megfelelő morfológiájú kristály előállítására. A krisztallográfia I. alaptörvénye a lapszögek állandóságának törvénye (1669 Steno). Prof Alessia Bacchi és kutatócsoportja¹⁴ egy Ru komplex példáján mutatja be (10. ábra), hogy miként változik egy kristály habitusa



10. Ábra. Egy Ru komplex vegyület kristályai¹⁴, melyek szerkezete azonos, megjelenésük különböző a kristályosító oldószer függvényében.

annak függvényében, hogy milyen oldószerből kristályosították. A sematikus ábra világos szürke kristálya azt a kristályformát ábrázolja, amely akkor keletkezne, ha a kristály egyes lapjainak növekedési sebessége azonos lenne. A bennük feltüntetett sötétszürke kristály az egyes oldószerekből növekvő kristály alakját jelzi, mely megfelel a felettük lefényképezett kristályok formájának. A különböző oldószerek különböző mértékben befolyásolták az egyes lapok növekedési sebességét. A fényképeken látható kristályok mind kémiai, mind kristályszerkezet szempontjából azonosak, bár megjelenésük különböző.

6. Röntgendiffrakciós szerkezet meghatározás és az adatbankok

A röntgendiffrakció száz éve alatt meghatározott szerkezeteket adatbankokban gyűjtötték össze, az anyagi minőség szerint csoportosítva. A fémek és ötvözetek a CRYSTMET® adatbankban (www.tothcanada.com), a szeretlen szerkezeteket a karlsruhei Szeretlen Szerkezeti Adatbankban (www.fiz-informationsdienste.de/en/DB/icsd/), a szerves és fémorganikus vegyületek, komplexek a Cambridge-i Krisztallográfiai Adatbázisban (CSD) (www.ccdc.cam.ac.uk), a 24 egységnél nagyobb polipeptideket és poliszacharinok tartalmazó vegyületek a Protein Adatbankban (PDB) (www.rcsb.org/pdb/) az oligonukleotidok a Nukleinsav Adatbankban (NADB) (ndbserver.rutgers.edu/) található. A Cambridge-i Krisztallográfiai Adatbázis¹⁵ tartalmaz minden legalább egy szénatomot tartalmazó szerves és fémorganikus vegyületet, melynek szerkezetét röntgen vagy neutron diffrakcióval, egykristály vagy pordiffrakcióval határozták meg. Az adatbank ma már több mint félmillió szerkezetet tartalmaz. A Cambridge-i Szerkezeti Adatbázis leggyakoribb felhasználási területei:

- Főbb molekuláris dimenziók, fém koordinációs szféra geometriájának meghatározása.
- Modell koordináták szolgáltatása szerkezet validáláshoz, szerkezet finomításban használt megkötésekhez nyújt adatokat.
- Konformációs analízis és háromdimenziós farmakofor elrendeződések meghatározása.
- Hidrogén kötések és más nem-kötő kölcsönhatások előfordulásának, geometriájának vizsgálata.
- Szerkezeti korreláció és reakcióút analízis.
- Kristályépítészet (crystal engineering) és kristályszerkezet jóslás.
- Molekula modellezés és racionális gyógyszerhatóanyag tervezés, protein-ligandum kölcsönhatások tanulmányozása.

7. Összefoglalás

A kutatási irányok súlypontjai a röntgendiffrakció 100 éve alatt változtak. Az első hősi időkben az egyszerű sók és ásványok szerkezetének felderítése zajlott. A XX. század hatvanas éveit a kovalens molekulák szerkezeti megismerésének időszaka. A kismolekulás szerkezetkutatás egyik legfontosabb területe manapság az intermolekuláris kölcsönhatások megismerése. Jean-Marie Lehn mondta ki, aki szupramolekuláris kémiai kutatásaiért 1988-ban kapott

Nobel-díjat, hogy az anyag tulajdonsága egyrészt függ az alkotóelemek természetétől, másrészt a közöttük lévő kölcsönhatásoktól. Így a másodlagos kölcsönhatásoknak szerepük van a gyógyszerkémia területén a molekuláris felismerési folyamatokban és a biológiai makromolekulák aktivitásában. Láthattuk, hogy minden bemutatott példa szerkezetben mennyire meghatározó szerepe volt az intermolekuláris kölcsönhatásoknak.

Összefoglalva a röntgendiffrakció szerepét a gyógyszerkutatásban a bemutatott eseteken látható, hogy a molekula- és kristályszerkezet ismerete milyen sokrétű információval járul hozzá az új gyógyszerek kifejlesztéséhez, gyártásához. A röntgendiffrakció módszerével információt kaphatunk az anyag összetételéről, konformációjáról, kiralitásáról, izostrukturalitásáról vagy polimorfijáról, a másodlagos kölcsönhatások rendszeréről, az anyag szerkezete és fizikai-kémiai tulajdonságainak kapcsolatáról, a kristály morfológiájáról, s mindezek az ismeretek összegyűjtve teszik lehetővé a tudatos kristály tervezést (crystal engineering), s az egyre megbízhatóbbá váló kristályszerkezet „jóslást”. A röntgendiffrakció széles körben alkalmazható, mint a gyógyszerkutatás műszeres módszere, de meghatározó módszer a mineralógiában, metallográfiában, kémiában, szilárdtest fizikában, molekuláris biológiában, anyagtudományokban stb. egyaránt.

„Egy eredeti kreatív vívmány szinte sohasem hirtelen megvilágosodás eredménye, nincs fejünkben kigyulladó villanykörte, hanem hosszú évek kemény munkájának gyümölcse.”¹⁶ Laue, Friedrich és Knipping előtt sokan sokféle anyagot kitétek röntgen sugárzásnak, de mindenki figyelme a direkt sugárzás abszorpciójára korlátozódott. A kristály rácsszerkezete elméletének ismerete hozta az elképzelést, hogy megvizsgálják a direkt sugár környezetét, a gyenge diffraktált sugárzást. Ez a különbség a tudás vezérelt kutatás és a véletlen felfedezés között¹⁷.

A szerzők a cikket a legidősebb élő magyar krisztallográfusnak dedikálják. Sasvári Kálmán (1912-) születése alig két

hónappal előzte meg az első röntgendiffrakciós kísérlet elvégzését. Egyúttal tisztelettel emlékezünk Simon Kálmánra (1946-2012), aki a Chinoín Zrt gyárban megteremtette a röntgendiffrakciós szerkezetkutatást.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki az OTKA (100801) támogatásáért.

Hivatkozások

- Schwarzenbach, D.: *Acta Cryst.* **2012**, *A68*, 57-67.
- Schmahl, W.W.; Steurer, W.: *Acta Cryst.* **2012**, *A68*, 1-2.
- Kitaigorodskii, A.I.: *Organic Chemical Crystallography*. Consultant Bureau, New York. **1961**.
- Bereczki, L.; Pálovics, E.; Bombicz, P.; Pokol, G.; Fogassy, E.; Marthi, K.: *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 260–264.
- Molnár, P.; Bombicz, P.; Varga, C.; Bereczki, L.; Székely, E.; Pokol, G.; Fogassy, E.; Simándi, B.: *Chirality* **2009**, *21*, 628-636.
- Hegedűs, B.; Bod, P.; Harsányi, K.; Péter, I.; Kálmán, A.; Párkányi, L.: *J. Pharm. Biomed.*, **1989**, *7*, 563-569.
- Lu, J.; Wang, X.J.; Yang, X.; Ching, C.B.: *Crystal Growth and Design*, **2007**, *7*, 1590-1598.
- Ferenczy, G.G.; Párkányi, L.; Ángyán, J.G.; Kálmán, A.; Hegedűs, B.: *J.Mol.Struct.:THEOCHEM*, **2003**, *503*, 73-79.
- Czugler, M.; Kálmán, A.; Kovács, J.; Pintér, I.: *Acta Cryst.* **1981**, *B37*, 172-177.
- Bombicz, P.; Czugler, M.; Tellgren, R.; Kálmán, A.: *Angewandte Chemie* **2003**, *17*, 1957-1960.
- Fábián, L.; Kálmán, A.; Argay, G.; Bernáth G.; Gyarmati, Z.C.: *Chem. Commun.* **2004**, 2114-2115.
- Kálmán, A.; Fábián, L.; Argay, G.; Bernáth G.; Gyarmati, Z.C.: *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 34-35.
- Báthori, N.B.; Bombicz, P.; Bourne, S.A.; Venter, G.: *New Journal of Chemistry*, **2010**, *34*, 405-413 (címlap).
- Bacchi, A.; Cantoni, G.; Cremona, D.; Pelagatti, P.; Ugozzoli, F.: *Angewandte Chemie* **2011**, *50*, 3198-3201.
- Allen, F.H.: *Acta Cryst.* **2002**, *B58*, 380-388.
- Csikszentmihályi Mihály: *Kreativitás. A flow és a felfedezés avagy a találekönység pszichológiája*. Akadémiai Kiadó. **2008**.
- Schmahl, W.W.; Steurer, W.: *Acta Cryst.*, **2012**, *A68*, 1-2.

The 100 years old X-ray diffraction in the pharmaceutical sciences

Experiencing classical crystallography for hundreds of years, the birth of modern crystallography took place 100 years ago, when Max von Laue, Walter Friedrich and Paul Knipping carried out the experiment that showed that X-rays were diffracted by crystals. Knowledge of the structure of matter at atomic resolution has revolutionary consequences for all branches of natural sciences: physics, chemistry, biology, earth sciences and material science¹. In order to understand the physical-chemical properties, the macroscopic characteristics of matter we must know its structure. 100 years after the Laue experience crystallography is still at

the cutting edge of science². Declared by the United Nations 2014 will officially be the International Year of Crystallography „IYCr2014”.

After a reminiscence of the centenary of the discovery of X-ray diffraction the paper presents applications of X-ray diffraction in the pharmaceutical sciences primarily on the role of chirality and the appearance of polymorphism. It includes structure - property relationship, whole and partial isostructurality, intermolecular interactions, cocrystal formation, crystal engineering and the affect of crystal habit in the knowledge of the structure.

Az NMR spektroszkópia szerepe és alkalmazási lehetőségei a modern gyógyszeriparban

Ifj. SZÁNTAY Csaba,* SZAKÁCS Zoltán, BÉNI Zoltán és DUBROVAY Zsófia

Richter Gedeon Nyrt, Szerkezetkutatási osztály, Gyömrői út 19-21, 1103 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Tapasztalatunk szerint a kémiai társadalom túlnyomó része az oldatfázisú NMR spektroszkópia gyógyszeripari szerepét ma is leginkább a kismolekulás szintézistámogató analitikával azonosítja. Kétségtelen tény, hogy az NMR spektroszkópia eme klasszikusnak mondható kémiai alkalmazása, azaz a szintetikus gyógyszerkémikusok által előállított intermedierek és végtermékek szerkezetvizsgálata jelenleg is a gyógyszeripari NMR spektroszkópai szolgáltatás legjelentősebb részét képezi világszerte. Ugyanakkor az ilyen típusú szerkezetvizsgálatok módszertanában olyan új lehetőségek nyíltak meg az utóbbi időkben, amik általában kevésbé köztudottak. Ezen túlmenően pedig számos egyéb olyan, a gyógyszeripari kutatás-fejlesztést és minőségbiztosítást hatékonyan és innovatív módon támogató NMR alkalmazás is előtérbe került, amelynek gyakorlati jelentősége, felhasználhatóságának lehetőségei és korlátai szintén kevésbé ismertek, illetve sokszor téves, vagy túlzottan optimista elképzelések alakultak ki velük kapcsolatban. Valójában ez utóbbi alkalmazások köre, valamint a mögöttük rejlő módszertani arzenál annyira tág, hogy ezen rövid keretek között még felsorolásszerűen sincs mód teljességükben áttekinteni őket. A jelen dolgozatban ezért elsősorban arra vállalkozunk, hogy röviden vázoljuk, illetve néhány gyakorlati példa megemlékezésével illusztráljuk a kismolekulás NMR-es szerkezetvizsgálatok modern műszerezettség mellett megnyíló lehetőségeit azoknak a szervezési elveknek és tapasztalatoknak az alapján, amelyek a Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutatási osztályának munkájához köthetők. Másodsorban, az NMR innovatív gyógyszeripari alkalmazásai közül nagyon röviden kitérünk a ligandum-receptor kötődésvizsgálatok legújabb lehetőségeire és korlátaira, valamint a kapcsolt technikák (elsősorban LC-NMR) alkalmazhatóságának jelen helyzetére.

Tárgyalásunk a következő két vezérfonalra épül. 1) Abban a privilegizált, de egyúttal fokozott felelősséggel is járó helyzetben vagyunk, hogy a Richter Szerkezetkutatási osztálya a régió legmagasabb szintű kiépítettséggel rendelkező NMR műszerparkjával rendelkezik, továbbá az osztály munkája sajátos módon illeszkedik a vállalati szervezeti struktúrába, ami a tipikustól sokban eltérő jellegű szerkezetvizsgáló szolgáltatásban testesül meg. Úgy véljük, hogy mindez olyan tapasztalatokat nyújtott és olyan szemléletet érlelt ki, amit ha teljességében nem is, de néhány vonatkozásában érdemes közkinccsá tenni. 2) Általános tapasztalatunk, hogy miután a tudományos-műszaki irodalom elsődlegesen valamely NMR alkalmazási terület sikeres eseteit publikálja, ezzel akarva-akaratlanul pozitív módon szűri a „valóságot”. Ebből adódóan az a

kép, amit egy (főleg még kiforrotlan) alkalmazási terület lehetőségeiről pusztán az irodalom olvasásával, vagy anekdotikus információra alapozva alkothatunk, gyakran nem megfelelően életszerű, ami irreális elvárásokat, sőt helytelen beruházási, illetve munkamódszertani döntéseket is eredményezhet.

A következőkben a fenti vezérlő gondolatok mentén, a gyakorlati életszerűség optikáján keresztül igyekszünk egy közel sem teljes képet nyújtani a modern NMR spektroszkópia gyógyszeripari alkalmazási lehetőségeiről a kismolekulás szerkezetvizsgálatok tekintetében. Ennek megfelelően tehát nem tárgyaljuk például a gyógyszeripari célú biomolekuláris alkalmazások (biomolekulák szimilitásának, kismolekulás szennyezéseinek, térszerkezetének vizsgálata, metabonómia, stb.) igen jelentős lehetőségeit, annak ellenére, hogy ezen vizsgálatok egy része az utóbbi néhány évben osztályunkon napi gyakorlattá váltak. Ez a terület önmagában is olyan tág és izgalmas, hogy egyrészt méltó tárgyalása a jelen dolgozat kereteibe nem férne bele, másrészt a mi gyógyszeripari környezetünkben a biomolekulák szerkezetvizsgálatának problémaköre legfőképpen az ún. bioszimilitások (azaz egy originátor által gyártott fehérjéhez minél hasonlóbb szerkezetű saját gyártású termék) szerkezet-analitikájának vonatkozásában merül fel, az ezzel kapcsolatos know-how elemek többsége pedig jelenleg vállalati titkot képez. Ugyanakkor a hazai biomolekulás NMR vizsgálatok művelésének néhány érdekes vonásába nyújt betekintést a Debreceni Egyetem^{1,2} és az ELTE kutatóinak³ a jelen folyóiratban nemrég megjelent közleményei.

2. A Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutatási osztályának bemutatása

A gyógyszeripari analitikára nehezedő kihívások (ebbe beleértve a szerkezetvizsgálatokat is) folyamatosan növekednek mind technikai, mind pedig adminisztratív értelemben. Ez többek között abban jelentkezik, hogy egyre rövidebb idő alatt egyre kisebb anyagmennyiségekből egyre biztosabban kell GLP (good laboratory practice) körülmények között szerkezeteket meghatározni és ezt magas szinten dokumentálni. Mindez egyre növekvő igényeket támaszt a probléma megoldásában érintett kutatók együttműködésének és személyes felelősségének tekintetében is. Különböző gyógyszeripari cégek különböző szintű tudatossággal, illetve más-más filozófiával, ebből adódóan pedig más-más technikai és szervezeti apparátus kiépítésével közelítik meg ezt a problémát.

* Főszerző. Tel.: 4314952; fax: 4326003; e-mail: cs.szantay@richter.hu

A Szerkezetkutatói osztály tevékenysége hangsúlyosan a „high-end” tömeg- és NMR spektroszkópiára, kisebb részben az IR spektroszkópiára, valamint az ezeket funkcionálisan kiegészítő kapcsolt elválasztási technikákra és egyéb szoftveres és hardveres támogatásra épül. Az osztály kis szerves molekulák, illetve biomolekulák szerkezetvizsgálatát célzó stratégiai nagyműszereket foglal egyetlen szakmai és szervezeti egységbe. Az a szerkezetkutatói szolgáltatás, amit az osztály nyújt a Richter számára öt olyan, egymással szoros összefüggésben levő jellemzőre épül, amelyek egyikének sem magától értetődő a megléte, ugyanakkor egyedileg is, de legfőképpen összességükben, ezek a jellemzők (szerintünk) egyedülálló minőségű és hatékonyságú szerkezetanalitikai támogatást biztosítanak. Az alábbiakban ezeket a jellemzőket vesszük röviden sorra.

2.1. Centralizált szerkezetkutatói szolgáltatás

A Richter a kiemelt képességű NMR és MS spektrométereit a cég egészét kiszolgáló központosított formában üzemelteti, ilymódon a cég egésze számára elérhető egy „state-of-the-art” spektrométerekre, ezek egymást komplementer módon kiegészíténi tudó jellegűre, valamint cég-specifikus humán know-how-ra épülő szerkezetfelderítési potenciál. Mint azt a bevezetőben említettük, a gyógyszeriparon kívül általában kevésbé ismert, hogy az oldatfázisú kismolekulás NMR szerkezetfelderítés valójában mennyi mindenre terjed ki a tradicionális szintézistámogató szerepén túl. Hogy a legfontosabb ilyen egyéb alkalmazásokat említsük: *a)* egy gyógyszerjelölt molekula főbb metabolitjainak szerkezetmeghatározása azzal a céllal, hogy ezek biológiai hatása tesztelhető legyen, és/vagy hogy ismeretükben a gyógyszerjelölt metabolikus stabilitása növelhető legyen; *b)* a méretnövelések során előálló nyomszennyezők meghatározása azzal a céllal, hogy a technológiai körülményeket a lehető legnagyobb tisztaságú hatóanyag előállítása érdekében lehessen optimálni (quality by design); *c)* a hatóanyag stabilitási tesztek során keletkező bomlástermékek szerkezetének meghatározása részint hatásági elvárásaként, részint pedig azért, hogy ezek ismeretében megfelelően hosszú lejáratú időt biztosító kiserelési formát lehessen fejleszteni; *d)* hatóanyag gyártási nyomszennyezők szerkezetmeghatározása szintén hatásági követelményként, valamint azért, mert a nyomszennyezői profil egy adott gyártási technológiát egyedi módon, jellemzően jellemzően jellemző, ezért ennek ismerete pl. a gyógyszeripari versenyhelyzetből adódó szabadalomtörési perekben kulcskérdés lehet; *e)* a nagyon szigorú analitikai ellenőrzések során a specifikációkon esetleg kívül eső gyártási hatóanyagszavakkal összefüggésben gyakran felmerül, hogy a probléma lehetséges okát szerkezetkutatói oldalról is vizsgálni kell, *f)* hasonló szerkezetvizsgálati kérdések merülnek fel készítményanalitikai szinten, amikor is a gyógyszerformula fejlesztése során megjelenő új nyomszennyezőket és degradánsokat kell azonosítani, ami a hordozóanyagok jelenléte miatt különösen nagy kihívást jelenthet; *g)* minőségellenőrzési céllal a hatóságok vagy más üzleti partnerek felé dokumentált szerkezetvizsgálati eredmények, amelyeknek egyik legfőbb célja, hogy szakmai tartalmukban és megjelenítési formájukban is kétséget kizáró módon tükrözzék az adott termék minőségét; *h)* vásárolt hatóanyagok, intermedierek, segédanyagok

analitikája kapcsán felmerülő szerkezetvizsgálatok, amelyek célja, hogy ellenőrizzük a beszállítónak a szerkezetre vonatkozó analitikai állításait (nem ritka, hogy a miénknél kevésbé fejlett NMR műszerezettség és tudást birtokló cégek helytelen szerkezettel, illetve szerkezeti interpretációval adnak el ilyen termékeket, amikor is a reklamációt csak egyértelműen meggyőző, saját szerkezeti analitikával tudjuk érvényre juttatni); *i)* szabadalmi beadványok és iparjogvédelmi perek kapcsán felmerülő szerkezetvizsgálatok – utóbbi esetekben többnyire az eljárásra jellemző intermedierek és/vagy szennyezők szerkezetét kell igazolni, olyan műszerezettség és szakmai érvek felvonultatásával, ami a bíróság számára nem hagy kétséget (egy ilyen per elvesztése a cég számára nemcsak közvetlen anyagi veszteségként jelentkezhet, hanem miután a gyógyszerek bizalmi termékek, az ezzel járó erkölcsi veszteség is rendkívül káros lehet, nem is beszélve az érintett szakemberek felelősségéről); *j)* új, természetes eredetű vegyületek szerkezetének azonosítása, *k)* végül, de nem utolsósorban, meg kell említeni a bioanalitikai szerkezetvizsgálatokat (amelyekre a fentebb említett okokból itt bővebben nem térünk ki).

Annak, hogy a fentebb vázolt feladatokat egy centralizált nagyműszeres szolgáltatás formájában valósítjuk meg, számos előnye van. Egy molekula vagy molekulacsalád, annak teljes gyógyszergyártási életciklusa során számos szervezeti egységet „megjár” és – amint azt a fentiek is érzékeltették – eközben számos különböző típusú szerkezetvizsgálati problémát vethet fel. A központosított szerkezetkutatói biztosság, hogy ilymódon egy helyen csapódik le és tárolódik mindaz az NMR spektroszkópiai ismeretanyag, ami az adott molekulacsaládhoz kapcsolódik. Ez lehetőséget ad például arra, hogy alapos ismereteket (célszerűen gyakran a szerkezet meghatározásához minimálisan szükségesnél mélyebb ismereteket) szerezzünk egy molekuláról még korai, szintetikus fázisában, amikor az viszonylag nagy mennyiségben és tisztán áll rendelkezésre. Később ugyanezen az osztályon és többnyire ugyanannál az NMR szakembernél jelennek meg az adott molekulával kapcsolatosan felmerülő metabolit- vagy nyomszennyező-azonosítási problémák. Ebben a fázisban, lévén hogy többnyire már jóval kisebb, sokszor az NMR érzékenység határait súroló anyagmennyiségekkel kell elboldogulni és általában többkomponensű mintákkal kell dolgozni, lényegesen nehezebb, vagy éppenséggel lehetetlen azokat a spektrális információkat megmérni, amik a szerkezet egyértelmű megfejtéséhez ideális esetben szükségesek lennének. Ilyenkor a sikeres szerkezetmegfejtés érdekében gyakran kulcskérdés, hogy a korábban megszerzett ismeretek referenciaadatként rendelkezésre álljanak. A praxisunk során rengeteg olyan esettel találkoztunk, ahol egy ismeretlen nyomszennyező sikeres szerkezetmeghatározása döntően azon múlt, hogy a szükséges NMR spektroszkópiai háttér adatok osztályunkon rendelkezésre álltak.

2.2. „Főállású” spektroszkópusok

Érdekes dolog belegondolni az NMR (és a mellette komplementer információt nyújtó MS) spektroszkópia szerkezeti kémiai célú „művelésének” évtizedekre visszanyúló történetébe.⁴ Az oldatfázisú NMR spektroszkópia kismolekulás szerves kémiai alkalmazása

világszerte az 1970-es évektől kezdett robbanásszerűen terjedni. A „spektrumfejtés” tudománya ekkoriban még fejlődésének kezdeti stádiumában volt, tehát azok az ismeretek, szabályszerűségek, amik a szerkezetmeghatározás mesterségbeli know-how elemeit képezik, ekkortájt kerültek felfedezésre. Ezidőben többnyire a vállalkozó szellemű vegyészek még maguk próbálták megtanulni a spektruminterpretáció fogásait, hiszen ez eleinte nem tűnt nagyobb kihívásnak, mint pl. az ugyancsak általuk művelt és már megszokott IR spektrumértékelés. Az NMR spektroszkópia rohamos módszertani fejlődése, a spektrométerek komplexitásának növekedése és a mérés technikai know-how egyre sokrétűbbé válása azonban hamarosan „egész embereket” követelt meg erre a célra. Így léptek színre azok a vegyész munkát támogató kismolekulás szerkezetanalízisre szakosodott NMR spektroszkópikusok, akik hatalmas NMR spektroszkópiai ismeretanyag és tapasztalat hordozóivá váltak.

Körülbelül az 1990-es évektől jelent meg a spektrométerek felhasználóbarát üzemmódban való működtethetőségének tendenciája, azaz a készülékek (bizonyos alkalmazási korlátok között) nem NMR szakemberek által is könnyen használhatókká váltak. Emellett a legalapvetőbb két-dimenziós (2D) NMR módszerek is rutin jelleggel megvalósíthatóvá váltak a legtöbb spektrométeren.⁵ Ezek a tendenciák indították el az „önkiszolgáló” (open-access) NMR spektrométerek korszakát, abból a megfontolásból kiindulva, hogy a „fool-proof” mérési beállításokkal elkészíthető modern 2D technikák birtokában a vegyészek kevesebb „klasszikus” NMR ismeret birtokában is hatékonyan tudják monitorozni szintéziseiket. Ezzel párhuzamosan az NMR spektroszkópikusok egyre inkább a biomolekulás szerkezeti problémákra kezdtek koncentrálni, így a kismolekulás vizsgálatok sok intézményben számottevő mértékben visszakerültek a szintetikus vegyészek saját hatáskörébe. Bár ez a tendencia az egyik oldalon hasznosnak bizonyult, elsősorban bizonyos vegyületcsaládok rutin jellegű vizsgálatánál, a másik oldalon komoly veszélyei is vannak. Egyrészt számos esetben a „rutin” 2D spektrumok nem elégségesek a szerkezetek helyes megfejtéséhez, illetve az NMR spektroszkópiailag nem igazán „vájtszemű”, és a várt szerkezet iránt gyakran elfogult vegyész könnyen téves szerkezetre jut (amire sok példa található az irodalomban is). Másrészt félővé vált, hogy a kismolekulás NMR szakterület szűkülésével kikopnak a szakmából azok az élő szakismeretek, amelyek a 70-es 80-as években kiépültek, és amelyekre gyakran óriási szükség van (és mindig is lesz) az igazán megbízható és gyors szerkezetazonosításhoz. Felismervén ezt a problémát és ellensúlyozandó az előbb említett trendeket, a nemzetközi NMR szakma 1999-ben elindított egy a mai napig évente nagy sikerrel megrendezett konferencia sorozatot SMASH, azaz: „small molecules are still hot” néven, ami a kismolekulás NMR spektroszkópiai világ aktivitását és presztízsét hivatott fenntartani.

Mindezt azért volt fontos hangsúlyozni, hogy értsük, a fenti tendenciák fényében nem magától értetődő, hogy egy gyógyszeripari intézmény szervezeti, stratégiai, munkaköri, valamint funkcionális értelemben hogyan viszonyuljon a főállású kismolekulás NMR (vagy MS) spektroszkópiai szakma státuszához. Tapasztalataink alapján azonban teljes egyértelműséggel kijelenthetjük,

hogy egy a minőség, a hatékonyság és a versenyképesség növelése iránt elkötelezett cég, mint amilyen a Richter is, akkor jár el helyesen, ha ez a specializált műszeres, mérés-módszertani és spektruminterpretációs szaktudás mindenkor megfelelő erővel a rendelkezésére áll. Érdemes ennek okaira néhány olyan tényezőt keresztül felhívni a figyelmet, amelyek a gyógyszeriparon kívül nemigen ismertek, de jelentőségük még a gyógyszeriparon belül sem általánosan ismert vagy felismert. Egyrészt fontos hangsúlyozni, hogy egy olyan közegben, ahol minden tévesen megállapított molekulászerkezetnek nagyon komoly üzleti vonzata lehet, fokozottan indokolt lehet, hogy a szerkezetmeghatározás független analitikai szemmel történjen, hiszen a vegyészek óhatatlanul inkább hajlamosak a saját szintetikus munkájuk során várt szerkezetet „belelátni” a spektrumokba. Másrészt a gyógyszeriparban nem csak az analitikai eredmény a fontos, hanem az adatok GLP szempontok szerinti mérése és dokumentálása, illetve az eredmények hatósági szempontból megfelelően meggyőző és szakmailag helytálló írásos közlését is. Ez pedig a szakterület csínjait-bínjait jól ismerő, azért felelősséget vállaló és abban felelősségre is vonható szakembereken keresztül biztosítható a leginkább. Harmadrészt a fentebb említett centralizáltság nyilvánvalóan csak egy „dedikált” spektroszkópiai csapattal valósítható meg ideális módon. Mint ahogy a 2.1. pontban már tárgyaltuk, ennek nagy előnye, hogy ugyanaz az NMR szakember végig követheti egy molekula vagy molekulacsalád gyógyszeripari életciklusát a kezdeti szintézistől a metabolitokon át a gyártási nyomszennyezőkig és bomlástermékekig, ezzel sokszor nagymértékben felgyorsítva és biztosabbá téve utóbbiak szerkezetmeghatározását. Negyedrészt az is nyilvánvaló, hogy csak professzionális spektroszkópusoktól várható el reálisan, hogy a versenyképesség fenntartásához szükséges új metodikák fejlődését nyomon kövessék és a szükséges módszereket adaptálják, illetve új műszeres beruházásokat iniciáljanak.

2.3. Holisztikus munkafilozófia

Osztályunk alapvető céljának tekinti a lehető legkisebb átfutási idő mellett a lehető legtöbb esetben az egzakt szerkezeti megoldásra és ennek megfelelő részletességű spektrális karakterizálásra való törekvést. Bár ez a szándék banálisan magától értetődőnek tűnhet, gyakorlati megvalósítása számos nehézségbe ütközik, és számos döntési helyzetet vet fel. Osztályunkra évente átlagosan mintegy 3000 minta érkezik szerkezetvizsgálatra, ezeknek kb. 10%-a eltér a vegyész vagy a kémiai intuición alapján várt szerkezettől, és kb. ugyanilyen mértékben fordulnak elő olyan esetek, amikor a „rutin” spektrumok felvételével csak NMR alapon, vagy csak MS alapon történő szerkezetmeghatározás helytelen eredményre vezetett volna! Ugyancsak gyakori helyzet például az, hogy egy vegyület szerkezetében nagy valószínűséggel biztosak lehetünk pusztán az ¹H NMR spektrum egy részlete alapján – ez tehát önmagában még nem indokolná a lényegesen több műszer- és humán időt igénylő teljes ¹H és ¹³C asszignáció elkészítését és MS spektrumok felvételét – de a téma egy későbbi fázisában, amikor ezeknek az adatoknak a megszerzésére nem vagy csak nehezen van lehetőség, kulcsfontosságúvá válhatnak. Ilyen eset állhat elő például egy rokon molekula vizsgálatánál, vagy mert hatósági/szabadalmi céllal utólag a molekula teljes spektrális jellemzésre van szükség. Munkafilozófiánk

szerint ezért a lehető legnagyobb szerkezeti biztonság illetve a „proaktív” adatgyűjtés érdekében minden mintáról készítünk MS spektrumokat és törekszünk arra, hogy az átfutási idő minimalizálásának kényszere által nyújtott lehetőségeken belül a lehető legtöbb mintáról készüljenek a teljes ^1H és ^{13}C asszignációt lehetővé tevő NMR spektrumok, továbbá törekszünk a kísérleti adatokkal konzisztens összes szerkezeti alternatíva tudatos keresésére és kizárására.^{6,7,8,9} Ennek megfelelően az osztály csakis az NMR, IR és MS spektroszkópus szakemberek konszenzusa alapján ad ki szerkezetet, tehát az egymásnak ellentmondó vagy ellentmondani látszó NMR, IR és MS kísérleti adatok és/vagy következtetések esetében az ellentmondás okait minden esetben fel kell tárni. Hangsúlyozzuk, hogy az a munkamódszer, amely szerint a szerkezetvizsgálati eredmények főállású NMR és MS spektroszkópusok napi szintű szoros munkahelyi konzultációban történő egyeztetése, és a fenti filozófiára alapozott felelősségvállalása alapján születnek, igen ritka. Ugyanakkor ennek a munkastílusnak a haszna igen gyakran tetten érhető, legfőképpen amikor csak a két módszer együttműködése világít rá egy váratlan szerkezeti problémára.

2.4. Csúcsműszerezettség

Amint a fenti tárgyalásunk érzékeltette, a szerkezetkutatás átszövi egy gyógyszergyár tevékenységének szinte egész vertikumát. Az, hogy egy gyógyszer cég erre a célra mekkora és milyen színvonalú műszerparkot tartson fenn, illetve azt milyen szervezeti struktúrában üzemeltesse, korántsem egyszerű kérdés. Az egyik oldalon a gyógyszeripari versenyhelyzet és a folyamatosan szigorodó hatósági követelmények, a néha már abszurd mértékű minőségi elvárások, a lehető legnagyobb tudású spektrométerek alkalmazását látszanak kikényszeríteni, a másik oldalon azonban számolni kell ezeknek a készülékeknek a megvásárlási, fenntartási, infrastrukturális és amortizációs költségeivel. Mindez óriási összeg, ami ráadásul szinte exponenciálisan növekszik a megvásárolni kívánt készülékek teljesítőképességével. Erre a dilemmára való tekintettel egy gyógyszeripari cég számára a szerkezetkutatás szintjének és funkcionalitásának a meghatározása, valamint ennek a szolgáltatásnak a cégen belüli „pozicionálása” stratégiai kérdés kell (vagy kellene), hogy legyen. Véleményünk szerint egy cég stratégiai nagyműszereinek (NMR, MS) színvonala jól tükrözi a cég elkötelezettségét a kutatás és a termelés minősége, valamint az innováció iránt.

A Szerkezetkutatási osztály oldatfázisú NMR műszerparkja jelenleg egy 400 MHz-es, részben „open-access” céllal is használt „workhorse” készülékből, egy 500 MHz-es, hűtött mérőfejjel ellátott készülékből, és a régióban egyedülálló kiépítettségű, hűtött mérőfejjel, valamint LC és SPE kiegészítővel ellátott ultranagy érzékenységű 800 MHz-es spektrométerből áll (1. Ábra). Az alábbiakban ennek a készüléknek a gyógyszergyári funkciójáról és jelentőségéről szólunk néhány szót.

A Richterben üzemelő 800 MHz-es készülék különlegessége, hogy világviszonylatban is ritka módon, kettős felhasználási céllal került megvásárlásra. A jelenlegi általános gyakorlatban ugyanis a 300–600 MHz-es NMR készülékeket tekintik „kémiai frekvenciás”, azaz „kismolekulás”

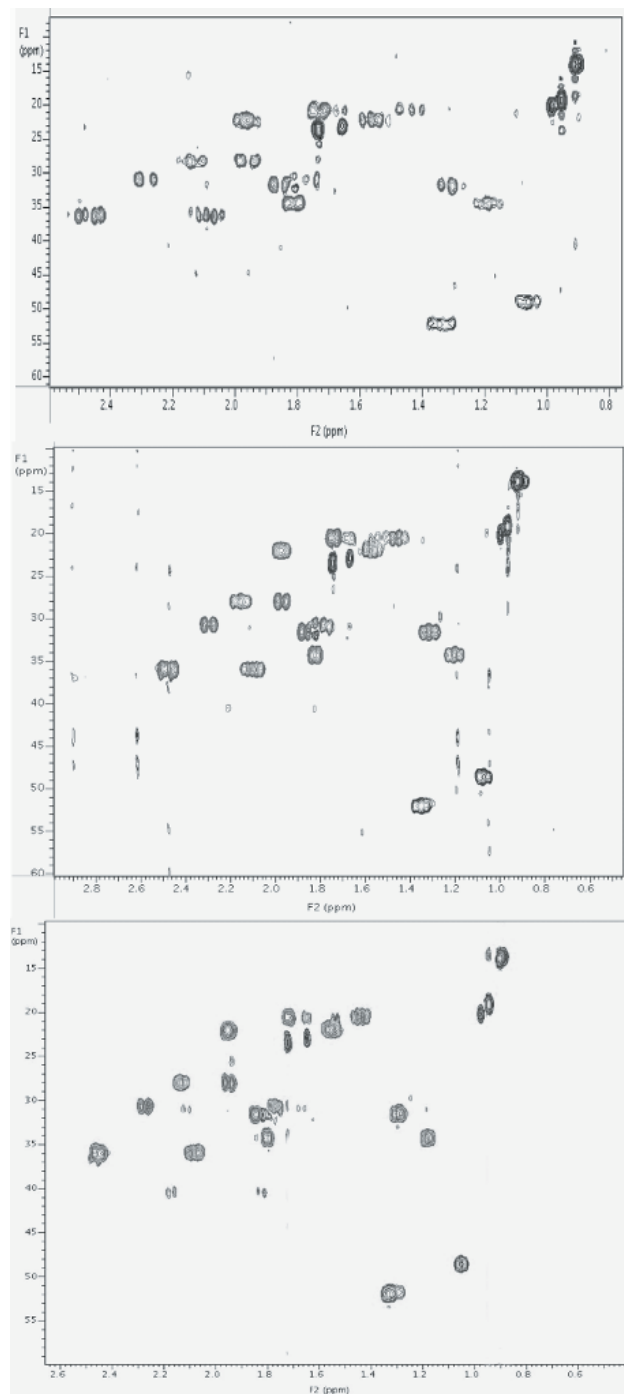
készülékeknek, a 700–950 MHz-es spektrométereket pedig „biológiai frekvenciás”, azaz elsősorban vagy kizárólagosan „nagy-molekulás” kutatási céllal használt készülékeknek. A Richter 800 MHz-es készülékét egyszerre használjuk kis- és nagymolekulás vizsgálatokra, ami főleg abban a tekintetben, hogy ilyen nagy térerőn rutinszerűen mérünk kismolekulákat, viszonylag szokatlan. Ugyanakkor ennek a megközelítésnek óriási gyakorlati előnyei vannak a gyógyszeriparban. Ennek okait érzékeltetendő, fontos rávilágítanunk az NMR mérési érzékenység kérdésének néhány elvi és gyakorlati vonatkozására.^{10,11}



1. Ábra. A Szerkezetkutatási osztályon üzemelő 800 MHz-es NMR spektrométer mágnes.

Amint az jól ismert, az NMR spektroszkópia páratlanul részletgazdag, atomi szintű információt tud nyújtani egy molekula szerkezetéről. Hasonló részletességű és egzaktágú strukturális adatokat csak az egykristály-röntgendiffrakció tud szolgáltatni, ami azonban nem ad molekuladinamikai információt és számos gyógyszergyári szempontból releváns probléma esetén – mint például a nyomszennyezők azonosításában – a felhasználhatósága rendkívül korlátozott. Ugyanakkor az NMR meglehetősen érzéketlen módszer, ezért az NMR mérési érzékenység javítására világszerte nagy erőfeszítések irányulnak. A számos lehetséges érzékenységnövelő technológia mellett kétségtelenül a leginkább robusztus (és így a különböző jellegű ipari K+F és minőségbiztosítási igényeket leginkább kielégítő) megoldást a különösen erős mágnesekkel (>700 MHz) kombinált hűtött mérőfej nyújtja. Amint az jól ismert, a térerő növelése növeli a minta makroszkópikus mágneszettségi vektorának abszolút értékét, ezáltal növeli a detektált jel nagyságát, tehát a mérési érzékenységet; ugyanakkor a rezonancia-frekvencia skálát is szélesíti, ezáltal növelve a spektrális diszperziót. A (meglehetősen drága) hűtött mérőfej esetében a tekercset, a hangolóköröket és az előerősítőt héliumgáz keringetésével 25 K-re hűtjük, ami az elektronikus zaj termikus részének (Johnson-zaj) csökkentésével redukálja a zajszintet, ezáltal 3–4-szeresére növelve a jel/zaj viszonyt és kb. tizedére csökkentve a mérési időt.¹² A Bruker-nél újabbán jóval olcsóbb beruházási és fenntartási költségű, nitrogénnel hűtött kriofej is elérhető (Prodigy®), ahol a jel/zaj arány növekedése kb. feleakkora.

A 800 MHz-es NMR spektrométer kiemelkedő érzékenységét és felbontását, összehasonlítva osztályunk másik két készülékével, a 2. Ábra illusztrálja.



2. Ábra. Ugyanabból a 3 mg-nyi szteroid mintából készített 2D ^1H - ^{13}C korrelációs spektrum (HSQC) részlete. A felső spektrum 400 MHz-en készült normál mérőfejjel 3 óra alatt, a középső spektrum 500 MHz-en hűtött mérőfejjel 22 perc alatt, az alsó spektrum 800 MHz-en hűtött mérőfejjel 5 perc alatt.

Mindennek a gyakorlati jelentősége a kismolekulás szerkezetvizsgálatokban óriási. Ezzel kapcsolatban érdemes az érzékenység jelentőségének két aspektusára felhívni a figyelmet, méghozzá a milligrammok és a mikrogrammok „világának” tekintetében.

A mikrogrammok világán belül, tehát az extrém kis mennyiségű minták vizsgálatánál könnyen érthetőnek tűnik, hogy miért lényeges a minél nagyobb NMR érzékenység, hiszen átlagos műszerezettség mellett az ismeretlen komponensek szerkezetét vagy csak alacsony biztonsági fokkal, vagy igen hosszú idő alatt, költséges és hosszadalmas mintagyűjtéssel, vagy egyáltalán nem lehet meghatározni. Ugyanakkor a nagy érzékenység és felbontás jelentőségének számos gyakorlati vonatkozását csak kevesen realizálják. Ezzel kapcsolatosan fontos hangsúlyozni, hogy az NMR spektroszkópia nagyságrendekkel érzéketlenebb, mint a tömegspektrometria, ami azt jelenti, hogy a gyógyszeripari szerkezetfelderítés egyik legfontosabb és leginkább problémás területén, azaz a mikroszennyezők és metabolitok világában nehéz az NMR-t és MS-t a holisztikus megközelítés jelentőségét szem előtt tartó módon “összedolgoztatni”. Az ultranagy NMR érzékenység éppen arra ad lehetőséget, hogy a lehető leggyorsabb és legbiztosabb szerkezetazonosítás érdekében a holisztikus megközelítést részben az NMR spektroszkópián belül, részben pedig a tömegspektrometriával karöltve jó minőségű és bőséges adatok gyors begyűjtésével valóban meg tudjuk valósítani (ezt alább a 3.3. fejezet példáján keresztül illusztráljuk).

A nagy érzékenység ugyanakkor a milligrammok világában, tehát elsősorban a szintetikus vegyészek által szolgáltatott minták vizsgálatánál is hallatlan előnyöket nyújt a gyakorlatban. Miután egyetlen minta teljes NMR asszignációja, azaz nagybiztonságú és a fentiekben említett “proaktív” NMR-es szerkezetmeghatározása tipikusan ^1H , ^{13}C és legalább négyféle további kétdimenziós NMR spektrum felvételét igényli (heterociklusok konstitúciójának igazolásához gyakran még többkötésű ^1H - ^{15}N korrelációs spektrumra is szükség van), egy átlagos kismolekula 3 mg-nyi mennyiségének teljeskörű NMR vizsgálata a 400 MHz-es készüléken kb. 15 órát, az 500 MHz-es készüléken kb. 4 órát, a 800 MHz-es készüléken pedig kevesebb, mint 1 órát igényel. Nagyobb molekulatömegű vegyületek (pl. biszindolok - lásd alább) esetében ezek a különbségek még drámaibb módon növekednek tovább. Ezen adatokból láthatóan a 800 MHz-es készülék érzékenysége és felbontása azt a lehetőséget adja, hogy rutinszerűen minden mintáról elkészítsük a teljes ^1H és ^{13}C asszignációhoz szükséges méréseket anélkül, hogy ez az átfutási időben veszteséget okozna. Ez nagyban növeli a szerkezetmeghatározás biztonságát, nagy valószínűséggel szükségtelenné teszi, hogy ugyanarról a mintáról ismételt mérésekkel további adatokat kelljen begyűjteni, amennyiben a spektruminterpretáció során kiderül, hogy az addigi adatok nem elégségesek. Lehetőséget ad arra is, hogy a vegyészek a korábban megszokottnál jóval kisebb mintamennyiségeket adjanak le vizsgálatra, és biztonságot nyújt abból a szempontból, hogy a teljes asszignáció utólag bármikor elkészíthető egy molekuláról (pl. szabadalmi beadványoknál). Akár többkomponensű mintákban a minor komponensek szerkezetét is meghatározhatjuk (elválasztás nélkül), ami rendkívül nagy segítséget jelent a vegyésznek. Ezáltal a 800 MHz-es NMR készüléken a napi gyakorlatban számos olyan szerkezetkutatósi feladat válik gyorsan és egyértelműen megoldhatóvá, ami 500, illetve 400 MHz-en nem, vagy csak lényegesen lassabban, vagy csak jelentősen nagyobb anyagmennyiségekkel, vagy jóval tisztábban előállított mintákból lehetséges.

2.5. Tudományosság

Mivel a gyógyszeripari kutatások elsődlegesen üzleti érdekeltségűek és többnyire vállalati titkot képeznek, az ilyen kutatásokból származó eredmények tudományos folyóiratokban való publikálása általában komoly nehézségekbe ütközik. Ugyanakkor a minőségi kutatói létnek, a kutatói szakmaiság fejlesztésének elengedhetetlen része a publikálás. A gyógyszeriparból származó tudományos publikációk továbbá erősítik egy cég piaci megítélését is, hiszen tükrözik a cég kutatásának minőségét („quality of science”). Éppen ezért osztályunk is elkötelezett aziránt, hogy ne csak ipari kutatóhelyként, hanem a lehetőségekhez képest tudományos műhelyként is működjék. Nemcsak meggyőződésünk, de a napi tapasztalatunk is az, hogy ez az – iparban korántsem mindenhol felvállalt – attitűd a mindennapi munkában is olyan igényességet és innovatív hozzáállást teremt, amely nélkül nem lehet igazán versenyképes és minőségi szerkezetkutatási szolgáltatást nyújtani.

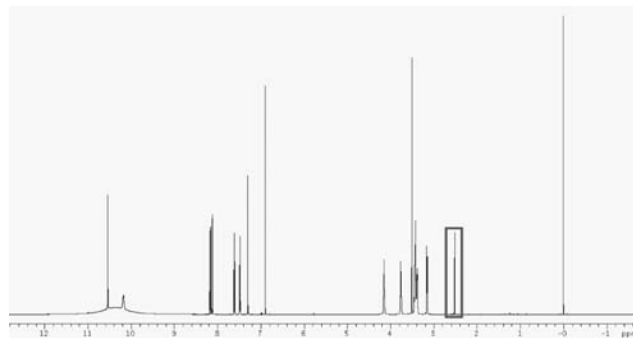
3. Példák

Az alábbiakban három közelmúltbeli és valós gyógyszeripari példával szeretnénk nagyon vázlatosan, inkább csak utalásszerűen, vagyis minden szakmai részletet mellőzve illusztrálni a fentieket.

3.1. Metánszulfonsav mennyiségi kimutatása

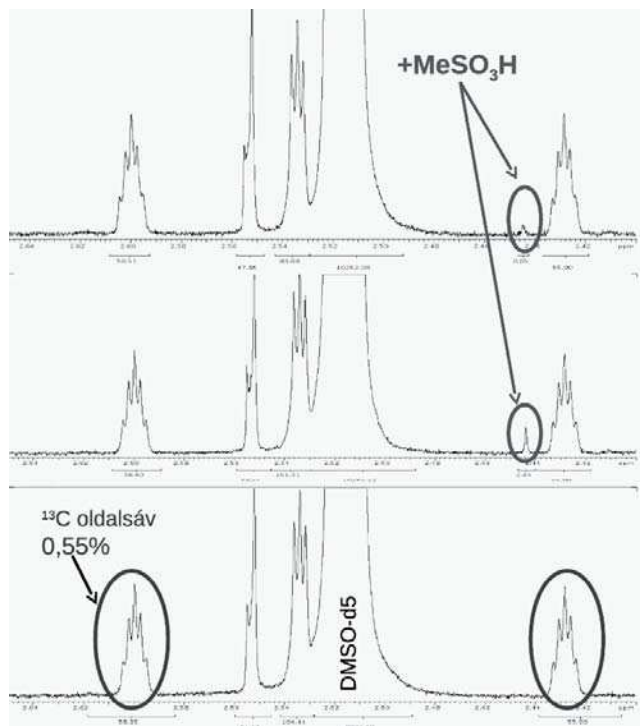
A közelmúltban egyik generikus hatóanyagunk esetében a gyártás kémiai hátterére hivatkozva a külföldi hatóság kérte annak bizonyítását, hogy a hatóanyagunk nem tartalmaz 20 ppm-nél nagyobb mennyiségben metánszulfonsavat, ami potenciálisan genotoxikus szennyezőnek tekinthető. Miután a hatósági kérésre a cégnek néhány napon belül reagálnia kellett, megfelelő GC-MS módszer kidolgozására nem volt idő, ezért a problémát nagyérzékenységű ^1H NMR mérésekkel kellett megoldanunk. A feladat teljesítése ^1H NMR-rel a MeSO_3H jelének megfelelően széles tartományú integrálhatóságát, azaz a hatóanyag közeli jeleitől való teljes elválását, valamint a hatóság által elvárt rendkívül kis kimutathatósági határ miatt ultra nagy mérési érzékenységet és felbontást követelt meg. Maga a hatóanyag csak $\text{DMSO-}d_6$ oldószerben volt megfelelően oldható, ezért további nehézségként merült fel, hogy a MeSO_3H metil jelének megfelelően el kellett válnia a $\text{DMSO-}d_5$ proton rezonancia jelétől, valamint annak ^{13}C szatellit jelétől is. Mindez csak 800 MHz-en volt megoldható. A vizsgált hatóanyag 800 MHz-es ^1H NMR spektrumát a 3. Ábra mutatja.

Ezt a spektrumot összehasonlítva ugyanezen minta 10 ppm (150 ng) metánszulfonsavval (4. Ábra, középen), valamint 2 ppm (30 ng) metánszulfonsavval addicionált spektrumával (4. Ábra, felül) megállapítható volt, hogy a hatóanyagban a metánszulfonsav NMR-rel kimutathatatlan (4. Ábra, alul) és biztosan nem haladta meg a 10 ppm, sőt még a 2 ppm-es mennyiséget sem. Főkomponens mellett ilyen kis mennyiségű potenciális szennyezés NMR spektroszkópiával történő kimutatására korábban sem mód, sem példa nem volt. A hatóság a bizonyítást elfogadta. Ez a példa nem szerkezetfejlesztési szempontból érdekes,



3. Ábra. A Richter által gyártott generikus hatóanyag 800 MHz-es ^1H NMR spektruma $\text{DMSO-}d_6$ oldószerben. A bekeretezett rész mutatja a $\text{DMSO-}d_5$ -től származó ^1H jelet, amelynek tövében kellett a MeSO_3H jelének hiányát bizonyítani.

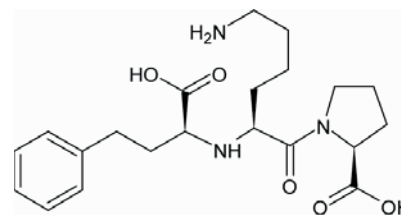
hanem azt demonstrálja, hogy bizonyos esetekben a csúcsműszerezettség házon belüli elérhetőségének milyen kritikus üzleti vonzata lehet.



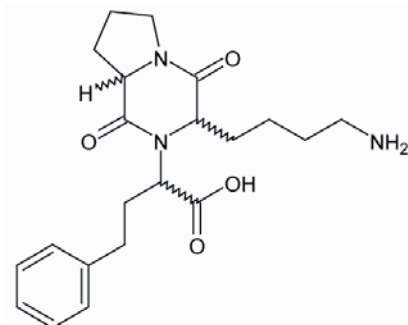
4. Ábra. A 3. Ábra hatóanyag spektrumának kinagyított részlete (alul), valamint a 10 ppm (középen), illetve 2 ppm (felül) metánszulfonsavval addicionált ugyanezen minta megfelelő spektrumrészletei.

3.1. Vásárolt diketopiperazin szerkezetének kritikája

Társaságunk régóta gyártja a lizinopril hatóanyagot (5. Ábra), aminek ismert potenciális szennyezői a diketopiperazinok (6. Ábra).



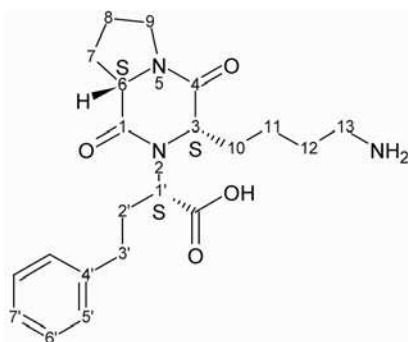
5. Ábra. A lizinopril hatóanyag képlete.



6. Ábra. Lizinopril-diketopiperazin szennyezők általános képlete.

A diketopiperazinok 3 sztereogén centrumot tartalmaznak, azaz 8 konfigurációs izomerként fordulhatnak elő (4 enantiomer pár), ráadásul bonyolult konformációs dinamikát mutatnak, ezért relatív konfigurációjuk azonosítása tipikus NMR feladat, de közel sem egyszerű. A téma tudományos igényességű („holisztikus”) vizsgálatának eredményeképpen egyik korábbi munkatársunk igen részletes tanulmányt publikált a vegyületcsalád NMR spektroszkópiai jellemzéséről.¹⁵

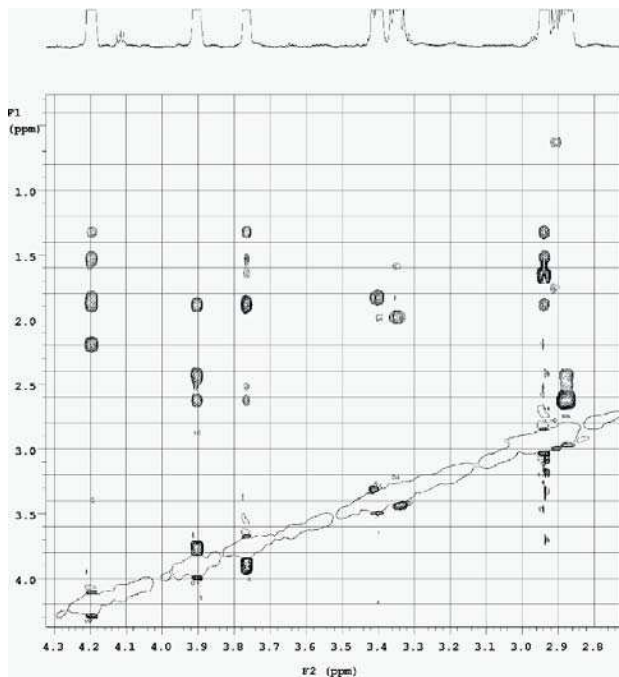
Nemrégiben a Richter szennyezési standardként egy neves külföldi cégtől 1'S3S6S konfigurációjú diketopiperazint vásárolt (7. Ábra).



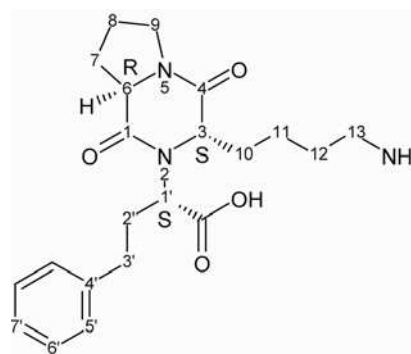
7. Ábra. Külföldi gyártótól vásárolt, névlegesen 1'S3S6S konfigurációjú lizinopril diketopiperazin standard képlete.

A mintához az elvárásoknak megfelelően analitikai bizonylat érkezett, többek között egy alacsony térerejű NMR karakterizálás. A beérkezett minta Richterben belüli HPLC analízise során azonban gyanús volt annak retenciós ideje, ezért a mintát szerkezetazonosítás céljából a kromatográfus kollégák NMR vizsgálatra küldték. A 800 MHz-en elkészített NOESY spektrum alapján (8. Ábra), valamint a molekulacsáladra vonatkozó korábbi igen részletes NMR háttérismereteink¹⁵ birtokában teljes egyértelműséggel bizonyítani tudtuk, hogy a vásárolt anyag valójában 1'S3S6R konfigurációjú (9. Ábra).

A példa azért érdekes, mert mutatja, hogy milyen fontos lehet a megfelelő tudományos háttér birtoklása egy üzleti probléma megoldásában. Ezekre az adatokra hivatkozva a Richter meggyőző, és minden vitát elkerülő módon tudta érvényesíteni reklamációját az ügyben. A példa azért is tanulságos, mert mutatja, hogy az igen magasintű analitikai apparátus meglétének milyen kulcsszerepe van minőségellenőrzési szempontból.



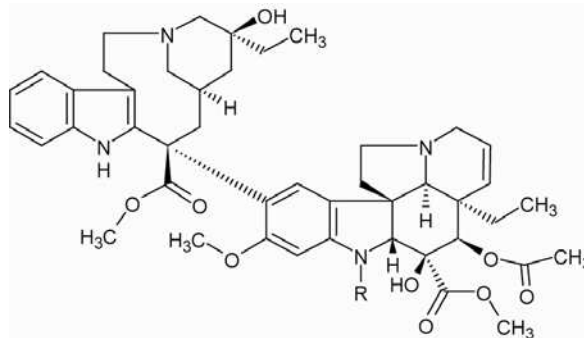
8. Ábra. Vásárolt diketopiperazin standard 800 MHz-es NOESY spektrumának részlete.



9. Ábra. A vásárolt diketopiperazin általunk megállapított helyes konfigurációja 1'S3S6R.

3.3. Vinblasztin és vinkrisztin szennyezők szerkezetmeghatározása

A vinblasztin (VLB) és vinkrisztin (VCR) a *Catharanthus roseus* nevű növény természetes, ún. „biszindol” alkaloidjai (10. Ábra), melyeket több mint 50 éve forgalmaznak rákellenes gyógyszerként.

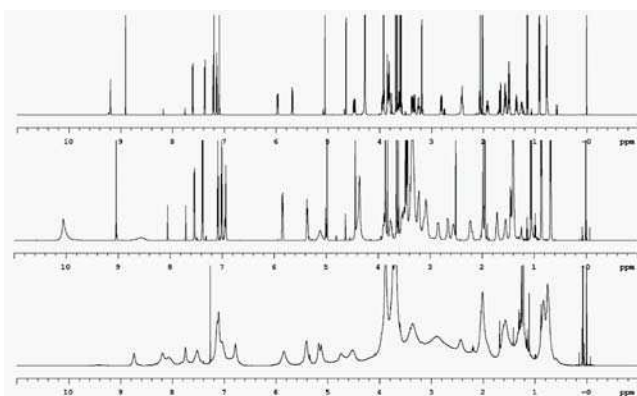


10. Ábra. A vinblasztin (R = CH₃) és a vinkrisztin (R = CHO) képlete.

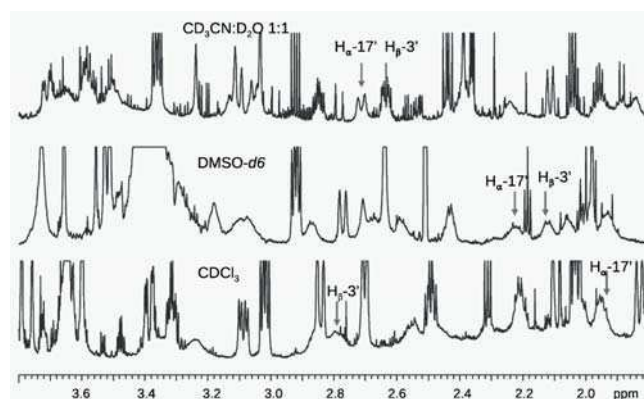
A Richter mindkét hatóanyagot nagy tisztaságban gyártja. A VLB extrakcióval és ezt követő kromatográfiás tisztítással, míg a VCR (miután a növényben jóval kisebb mennyiségben van jelen) a VLB-ból kémiai úton készül. A cég eljárásfejlesztést kezdeményezett a VLB kinyerés hatékonyságának fokozására. Az új eljárás üzemítése során a VLB frakciókban HPLC-UV alapján eddig ismeretlen rokon szerkezetű nyomszennyezések jelentek meg, így azonosításuk kritikusan fontos volt.

Az ilyen típusú biszindolok szerkezetének meghatározása elképzelhetetlen mélyreható NMR és MS vizsgálatok nélkül, ráadásul NMR szempontból is rendkívüli kihívásokat jelent a következő okokból.¹⁶ 1) Molekulaméreténél fogva igen zsúfolt spektrumokat ad, ami igényli a minél nagyobb térférő (és felbontás) alkalmazását. 2) Ugyancsak méreténél fogva speciális relaxációs tulajdonságokkal rendelkezik, ezért a szerkezeti szempontból nagyon lényeges információt nyújtó nukleáris Overhauser effektusok csak nehezen mérhetők. 3) A szerkezet biztos feltérképezése szinte minden esetben megköveteli a teljes ¹H és ¹³C hozzárendelés elkészítését, ami hosszadalmas 2D méréseket és spektruminterpretációt igényel. 4) Az előbbi igény teljesítése a nyomszennyezők esetében LC-NMR-rel kivitelezhetetlen (lásd 5. fejezet), ami mindenképpen szükségessé teszi a preparatív HPLC-s legyűjtést. 5) Miután maguk a hatóanyagok igen drágák, és a kérdéses szennyezők mennyisége a hatóanyagra nézve a 0,1% környékén van, rendkívüli jelentősége van annak, hogy mennyi az NMR vizsgálatokra minimálisan legyűjtendő anyagmennyiség, mert ennek megfelelő mennyiségű időt és hatóanyagot kell „beáldozni” a probléma megoldására. Ezt a problémát jól érzékeltetik a következő adatok: az 1980-as években az akkor rendelkezésünkre álló 300 MHz-es készüléken 80 mg tiszta biszindol mintából 4-5 nap kellett a szükséges 1D és 2D mérések elkészítéséhez. Az ismeretlen szennyezők ilyen mennyiségű legyűjtése természetesen rendkívül idő-, anyag- és költségigényes volt. Később, az 1990-es években a konvencionális mérőfejjel ellátott 500 MHz-es készüléken 2 teljes nap kellett a spektrumok elkészítéséhez 50 mg mintából. 2005 után, a hűtött mérőfejjel felszerelt 500 MHz-es spektrométeren már 20-30 mg mintából 1 éjszaka alatt elkészíthetők voltak a mérések. Jelenleg, a hűtött mérőfejes 800 MHz-es készüléken akár 10 mg alatti, szennyezésre nézve dúsított (nemcsak legyűjtött) mintából is 1 napon belül kivitelezhető az összes szükséges mérés, ami igen jelentős idő- és költségmegtakarítást jelent. Mindez ismételtelen mutatja a nagy mérési érzékenység gyakorlati jelentőségét. 6) A biszindolok konfigurációs szempontból bonyolult térszerkezettel rendelkeznek. 7) Az ismeretlen szennyezők szerkezetének meghatározása a gyakorlatban azt is igényli, hogy megfelelő NMR referenciaadatokkal rendelkezünk a hatóanyagokra nézve. A VLB és VCR hatóanyag szulfát só formájában kerülnek forgalomba. Bár a VLB bázis NMR irodalma jelentős, VCR bázisra, valamint VLB- és VCR-szulfátra nézve gyakorlatilag nincs érdemi NMR irodalom. 8) A biszindolok jellemző módon hajlamosak olyan konformációs dinamikát, illetve önasszociációs tulajdonságokat mutatni, amelyek rendkívüli módon szélesítik a rezonancia jeleket, ezzel nehezítve vagy megakadályozva a szükséges NMR jellemzők kimérését. A VCR esetében az *N*-formil csoport szobahőmérsékleten két, egymásba lassan átalakuló rotamerként van jelen, ami a jelek megkettőződését okozza, ezzel is növelve a mérések idejét,

és nehezítve az asszignációt. 9) A jelszélesedési problémák általában az oldószer megfelelő megválasztásával kezelhetők (11. Ábra), azonban a biszindolok ¹H kémiai eltolódásai is nagymértékű oldószer-érzékenységet mutatnak (12. Ábra).

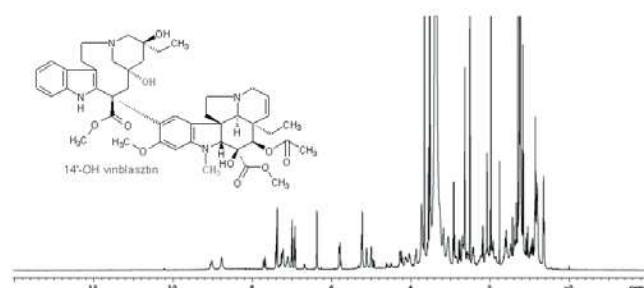


11. Ábra. A VCR szulfát ¹H NMR spektruma 800 MHz-en CD₃CN+D₂O 1:1 arányú elegyében (felül), DMSO-*d*₆-ban (középen) és CDCl₃-ban (alul).



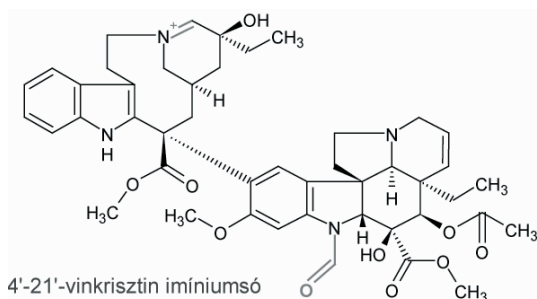
12. Ábra. Az egyik VLB szennyező (14'-OH VLB) ¹H NMR spektrumának részlete 800 MHz-en CDCl₃-ban (alul), DMSO-ban (középen) és CD₃CN+D₂O 1:1 keverékében (felül)

A fentiekre való tekintettel az ismeretlen biszindol szennyezők szerkezetének meghatározása először preparatív HPLC legyűjtést igényelt, amiből tipikusan 10 mg-nál kisebb tömegű, további szennyezőket is tartalmazó mintákat kaptunk szerkezetvizsgálatra. Illusztrációként az egyik ilyen szennyező (14'-OH VLB) különböző oldószerekben fölvetett NMR spektrumait mutatja a 12. és 13. Ábra. Ebben az esetben a szerkezet megfejtéséhez szükséges spektrumok mérési időigénye a következő volt: ROESY 2 óra, HMBC 5 óra, TOCSY 2 óra, HSQC 3 óra, ¹³C spektrum 10 óra.



13. Ábra. A 14'-OH VLB nyomszennyezőre nézve dúsított 5 mg mintából DMSO-*d*₆-ban készült 800 MHz-es NMR spektrum, valamint az általunk azonosított szerkezet.

Anyomszennyezők szerkezetének vizsgálatához szükség volt arra is, hogy referenciaadatként a VLB és VCR teljes NMR hozzárendelését elkészítsük különböző oldószerekben mind a bázis, mind a szulfát formákra, valamint hogy feltárjuk a kellemetlen jelszélesedések okait. Ezen vizsgálatok során tettük meg a felismerést, hogy a VLB/VCR sók a mono- és dikationos forma olyan egyensúlyaként vannak jelen, amely egyensúly helyzete érzékenyen változik az oldószers polaritásának és protikuságának függvényében. Nemrég publikált ezirányú eredményeink¹⁷ szilárd alapot nyújtottak ahhoz, hogy a kérdéses nyomszennyezők szerkezetét meghatározhassuk. Külön hangsúlyozandó, hogy az új vegyületek azonosítása szoros és kiegyensúlyozott együttműködést igényelt az NMR és nagyfelbontású MS-MS vizsgálatokat végző spektroszkópikusok között. Ennek jelentősége különösen a 4'-21'-VCR iminiumsó nyomszennyező (14. Ábra) azonosításának sok izgalmas fordulattal teli történetében jelentkezett, amelynek során az NMR és MS adatok közötti ellentmondások kísérletes iteratív jellegű feloldása vezetett a helyes szerkezethez.¹⁸



14. Ábra. A 4'-21'-vinkrisztin iminiumsó általunk meghatározott szerkezete.

Mindez jól illusztrálja, hogy egy-egy gyártási szennyező szerkezetének a meghatározása milyen sok gyakorlati nehézséget vet fel, és milyen kihívásokat jelenthet mind műszerezettségi, mind pedig intellektuális szempontból.

4. Ligandum-receptor kötődésvizsgálatok NMR spektroszkópiával

A kismolekulák fehérjekötődésének tanulmányozása biokémiai, racionális hatóanyagfelfedezési és fejlesztési, valamint farmakokinetikai szempontból egyaránt fontos feladat. Az interakciót mind a kismolekula, mind a makromolekula oldaláról vizsgálhatjuk NMR spektroszkópiával.¹⁹⁻²⁴

A fehérjén detektált módszerek közül a 2D ¹H-¹⁵N HSQC spektrum alkalmazása a leggyakoribb. Az amidprotonok korrelációs csúcsai a fehérjegerinc állapotát tükrözik és kismolekula hozzáadására történő változásaikból nemcsak a kölcsönhatás tényére, hanem annak erősségére és a fehérje kötőhelyére is következtethetünk.¹⁹⁻²⁴ Hátránya, hogy ¹⁵N izotópjelölt fehérje nagyobb mennyiségére (>100 μM) van szükség és kb. 30 kDa-nál nagyobb fehérjék esetén (jelszélesedés miatt) a ma elérhető legnagyobb térfogat esetén is csak a flexibilis doménekre korlátozva, speciális módszerekkel (pl. TROSY: transverse relaxation optimized spectroscopy, metil ¹³C-izotópjelölés²⁵) vagy egyáltalán nem alkalmazható.

A ligandum megfigyelésén alapuló módszerek fehérjeigénye 2-3 nagyságrenddel kisebb, és nincs szükség annak izotópjelzésére sem. Kötött állapotban a kismolekula a fehérjével alkotott komplexére jellemző relaxációs, diffúziós és NOE (nuclear Overhauser effect) tulajdonságokat vesz fel, jelei erősen kiszélesednek az oldatbeli szabad állapothoz képest. Ha két populáció között gyors a csere, kiátlagolt kémiai eltolódásokat, relaxáció-sebességeket (jelszélességeket) vagy diffúziós állandót mérhetünk.^{24,26} A gyors csere feltétele miatt a legtöbb ligandumalapú módszer csak a gyenge-közepes affinitású (K_d : 100 nM-10 mM) rendszerekre működik (kompetícióval erősebb kötődés is detektálható^{27,28}), ezeknek az ún. fragmensalapú gyógyszerfejlesztésben^{13,23,24} van jelentősége. Kötődő kismolekulák elegyekből történő azonosítására (szűrésére, NMR screening) érzékeny módszerek alapulnak ¹⁹F detektálásán,²⁹⁻³¹ közülük az ún. FAXS (fluorine chemical shift anisotropy and exchange for screening) kompetíciós kötődésvizsgálati módszer, amely fluorozott „kémligandumot” igényel, a nM-os enzimigényű 3-FABS (3 fluorine atoms for biochemical screening) funkcionális biokémiai esszé során pedig a fluorozott szubsztrát és a belőle adott idő alatt keletkezett termék molarányát mérjük NMR-el. A ligandum ¹H NMR jeleit detektáljuk a relaxációs ($T_{1\rho}$, T_2) módszerek^{24,31} vagy a telítésátvitel-differencia (saturation transfer difference, STD) esetén.^{32,33} Az STD során a fehérje egyes protonjait besugározva a telítési információ spindiffúzióval szétterjed a makromolekula egészére és a kötődő ligandum fehérjeközelbeni protonjaira is. Utóbbiak a kismolekula disszociációja után is megőrzik egy bizonyos ideig ezt a telítési információt, ami a kötődő molekularészlet rezonanciajeleinek intenzitásváltozásában jelentkezik egy üres tartományon besugárzott kontrollspektrumhoz képest.³² Vegyülettárak NMR alapú szűrése oldható fehérjével ma már a gyógyszeriparban is egyre gyakrabban alkalmazott módszer (a Richter NMR laboratóriuma is rendelkezik validált módszerrel), bár áteresztőképessége az újabb fejlesztések (érzékenységnövelés hűtött mérőfejekkel, 10-20 vegyületet tartalmazó elegyek szűrése) ellenére sem közelíti meg a HTS (high throughput screening) esszéjét, kivéve a szilárd hordozóhoz immobilizált fehérjét, automata átfolyó rendszert, speciális mérőcellapárt és ezen térfogatszelektív NMR ¹H detektálást megvalósító, szabadalommal védett ún. TINS (target immobilized NMR screening) módszert.^{35,36} Az aspecifikus kötődés miatti fals pozitív találatok komoly gyakorlati problémát jelenthetnek a ligandum alapú módszereknél, eliminálásuk referencialigandum leszorításával (kompetíció)^{33,34} vagy inaktivált fehérjét alkalmazó kontroll³⁵ mérésével lehetséges.

Membránfehérjékhez történő kötődés vizsgálata lényegesen problematikusabb, és jelenleg is alapkutatósi szinten, elsősorban akadémiai kutatóhelyeken művelt terület.³⁷⁻⁴⁰ Anyagtakarékosságuk miatt elsősorban ligandum oldali (STD, relaxációs) módszerek jönnek szóba. Kulcskérdés a fehérje stabilitásának, funkcionális formájának megőrzése a szolubilizálás³⁸ vagy immobilizálás (TINS)³⁶ során, jelenleg ez csak empirikusan kísérletezhető ki. Célravezető lehet a túlexpresszált célfehérjét tartalmazó membránpreparátumok alkalmazása,⁴⁰ ilyen inhomogén membránszuspenziókkal mi is végeztünk exploratív STD méréseket a Richterben. Mivel a ligandum aspecifikus kötődése, kitapadása sokkal valószínűbb egy lipideket is tartalmazó rendszerben (ezért

is alkalmazzák az STD továbbfejlesztett, kettős differencia változatát: STDD³⁸⁻⁴⁰), mint oldható fehérjék esetén, kontroll membránpreparátumok és speciálisan optimált kompetíciós titrálások nélkül könnyű túlinterepreálni egy esetleges pozitív kötődési eredményt.

Míg az NMR kötődésvizsgálatoknak nagyobb vegyülettárak szűrésében egyelőre alárendelt szerep jut, az NMR páratlanul értékes információt szolgáltathat egy-egy találat kötődési geometriájáról a racionális hatóanyagfejlesztés számára. A már említett STD,⁴¹ valamint az újabb AFP-NOESY (adiabatic fast passage nuclear Overhauser effect spectroscopy)⁴² és DIRECTION (difference of inversion recovery rate with and without target irradiation)⁴³ módszerekkel a ligandum fehérjéhez legközelebbi protonjai azonosíthatók (epitóp feltérképezés). Transzferált NOESY alapján a kötődő ligandum geometriáját,^{44,45} interligandum NOE-k (ILOE) alapján pedig egy fehérje szomszédos helyein kötődő vegyületeket azonosíthatunk,^{22,45} a dokkolással kombinált INPHARMA (interligand NOEs for pharmacophore mapping) módszer⁴⁶ pedig két, ugyanarra a helyre kompetitíven kötődő ligandum relatív (esetleg abszolút) orientációját képes meghatározni. Az NMR-rel kapható ligandumoldali szerkezeti információ különösen értékesnek bizonyulhat membránfehérjére történő hatóanyagfejlesztés során, ahol általában a röntgenszerkezet nem ismert.

5. Kromatográfiával kapcsolt NMR

Az LC-NMR gyógyszeripari felhasználhatóságának kérdése (elsősorban metabolitok és nyomszennyezők szerkezetvizsgálatában) folyamatos és élő probléma, hiszen gyakran olyan operatív dilemmát vet fel, mint hogy a kérdéses minor komponenst célszerű-e inkább preparatív HPLC-vel legyűjteni és ebben a formában küldeni szerkezetmeghatározásra, vagy ez a lépés kikerülhető a megfelelő LC-NMR vizsgálatokkal. Bár sokszor nem lehet pontosan előre tudni, hogy ilyen esetekben mi a legbölcsebb döntés, a helyzet elemzéséhez rendkívül fontos annak megértése, hogy mire képes (és mire nem) az LC-NMR, legfőképpen pedig igen fontos azt látni, hogy a közhiedelemmel szemben az LC-NMR nem „spórolja meg” ab ovo a preparatív legyűjtést.

Ugyan a folyadékkromatográf direkt kapcsolását az NMR spektrométerhez (online LC-NMR) már a hetvenes évek végén megvalósították,^{47,48} elsősorban az NMR mérőfejek érzékenysége, valamint a megvalósításhoz szükséges speciális hardver- és szoftverigény miatt a technika alkalmazhatósága a kilencvenes évek végéig csak nagyon szűk területekre korlátozódott. Az utóbbi két évtized technológiai fejlesztései, így a drasztikus NMR érzékenységnövekedés (hűtött mérőfejek, „micro-(cryo)-probe-ok” megjelenése), az átfolyó küvettek kifejlesztése, valamint a hatékony oldószerelnyomási szekvenciák kidolgozása után került az LC-NMR technika arra a szintre, hogy a készülékek kereskedelmi forgalomban elérhető eszközökké váltak. Ennek következményeként az utóbbi évtizedben ugrásszerűen megnőtt az LC-NMR technika különböző tudományterületeken való alkalmazási lehetőségeivel foglalkozó szakkikkek és összefoglalók száma.^{49,50} Ezen területek között a gyógyszeripar szempontjából elsősorban

az új természetes vegyületek növényi extraktumokból való azonosítása, adott gyógyszervegyületek/jelöltek metabolizmusának a kutatás egyre korábbi fázisaiban való feltérképezése, valamint a hatóanyagok, készítmények fejlesztése során felbukkanó szennyezések, bomlástermékek azonosítása bír kiemelt jelentőséggel. A kromatográfiával (és egyéb elválasztástechnikákkal) kapcsolt NMR spektroszkópiai vizsgálatok megjelenése előtt ilyen típusú problémákat a keresett komponens komplex mintából való dúsítását, illetve (preparatív kromatográfiás) izolálását az NMR spektroszkópia klasszikus „off-line” alkalmazásával valósították meg. Az LC-NMR megjelenésével lehetőség nyílt arra, hogy az ilyen problémák a sok esetben hosszadalmas és költségigényes dúsítási, izolálási lépés kihagyásával is megoldhatóak legyenek.

Mindamellet, hogy a közlemények (elsősorban akadémiai intézetekből) száma az elérhető műszerezettséggel párhuzamosan ezeken a területeken is folyamatosan növekedett és növekszik, az on-line LC-NMR várt, széles körű elterjedése mégsem következett be a gyógyszeripar területén. Ennek legfőbb szakmai oka az, hogy a gyakorlati megvalósítást tekintve az NMR spektroszkópia off-line használatával összehasonlítva korántsem egyértelműek az on-line LC-NMR nyújtotta előnyök. Az „on-line versus off-line NMR” kérdés problematikája szinte a kezdetektől jelen van az LC-NMR, illetve a fent felsorolt problémákat gyakorlati szempontból tárgyaló szakirodalomban.^{7,51,52,53} Ennek az összehasonlításnak sarkalatos kérdése továbbra is az NMR érzékenység, hiszen ez még a ma elérhető nagy érzékenységű spektrométerek esetében is limitáló tényező. Ha egy tipikus metabolitazonosítási feladatot tekintünk, ahol például egy 10–50 μM oldhatóságú, 400 körüli relatív molekulatömegű gyógyszerjelöltből mintegy 10–30%-ban képződik metabolit, utóbbi koncentrációja a rendelkezésre álló biológiai mintában kb. 400 ng – 6 $\mu\text{g/ml}$. Ez a koncentráció a biztos szerkezetazonosításhoz szükségesnek a legalsó határa, és még akkor is csak korlátozott információtartalmú spektrumokat (1D és homonukleáris 2D ^1H) remélhetünk reális időbefektetéssel, ha a metabolit tisztán izolálva, deuterált oldószerben lenne ilyen koncentrációban feloldva. Ezzel szemben a metabolitvizsgálatra kapott biológiai minta általában limitált térfogatú, H_2O alapú és nagy pufferkoncentrációjú (sótartalmú), és az utóbbi komponensek további zavaró protonjeleket hozhatnak a spektrumba. Az on-line LC-NMR alkalmazás ekkor azt a feladatot rója az analitikusra, hogy olyan kromatográfiás módszert dolgozzon ki, ahol a fenti biológiai minta nagy részének egyetlen injektálásával a keresett komponens minél nagyobb mennyiségét az átfolyó cellába tudja juttatni. Ezen túlmenően, költséghatékonysági szempontokat is tekintve, a kromatográfiás módszert úgy kell optimálnia (protonált eluensek deuterált oldószerre való cseréje, tipikusan D_2O és CH_3CN eluensek használata, a termosztálás szűkebb tartománya), hogy a mért NMR spektrumokban a kérdéses komponens jeleiből minél kevesebb essen az oldószerelnyomás miatt használhatatlan tartományokba. Hasonló kihívásokkal kell szembesülnünk szennyezések szerkezetfelderítése, illetve természetes vegyületek extraktumokból történő azonosítása során, ahol az elérhető mintatérlet és összetétel ugyan általában eltér a fenti scenáriótól, ám az NMR szempontokat továbbra is szem előtt kell tartani a sikeres megoldás érdekében.

A gyakorlatunk azt mutatja, hogy problémás szerkezetű és igen kis anyagmennyiségben rendelkezésre álló minták esetében a legbiztosabb módon a multinukleáris NMR és MS vizsgálatok kombinációja vezet egyértelmű eredményre. A holisztikus megközelítés a gyakorlatban akkor kivitelezhető a legmegfelelőbb módon, ha módunk van off-line NMR vizsgálatokra, hiszen ekkor lehetőségünk van az összes szükséges időigényes speciális NMR felvétel elkészítésére anélkül, hogy a mintának az LC küvetében való diffúziója időbeli limitet szabna a méréseknek. Ezen túlmenően off-line üzemmódban lehetőségünk adódik arra is, hogy a mintát bármikor visszategyük a spektrométerbe, ha újabb NMR kísérletek válnak szükségessé a szerkezet megfejtéséhez (ez tipikusan az első méréseket követő spektruminterpretáció során szokott felmerülni). Mindezen túl az off-line üzemmód tudja a legbiztosabban garantálni, hogy a tömegspektrometriás kollégák ugyanarról a molekuláról készítették el a nagyfelbontású MS-MS spektrumokat.

Mindent egybevetve, olyan életszerű helyzetekben, amikor a lehető leggyorsabban kell pl. egy ismeretlen nyomszennyező szerkezetét meghatározni, közel sem egyértelműek az LC-NMR előnyei, és az ideális munkamenet kidolgozása a fenti kérdések gondos mérlegelését igényli.

Az LC-NMR hátrányait kiküszöbölendő, az utóbbi évtizedben az on-line LC-NMR alkalmazásokról a fókusz (a fenti területeket figyelembe véve) egyre inkább az „at-line” LC-SPE-NMR felhasználás felé látszik eltolódni. A két módszer között az alapvető különbség az, hogy az LC-SPE-NMR esetében a keresett komponens kromatográfiás elválasztását követően azt egy szilárd fázisú extrakciós tölteten dúsítjuk, majd a megfelelő deuterált (!) oldószerben oldva végezzük el a szükséges NMR spektroszkópiai méréseket. Ez az elrendezés sokkal közelebb áll a klasszikus off-line NMR alkalmazáshoz. Az on-line LC-NMR-rel összevetve előny, hogy a legtöbb esetben nincs szükség a kromatográfiás rendszer NMR szempontokat is figyelembe vevő optimalására, és a tisztaságvizsgálati vagy pedig a keresett metabolit detektálására és kvantifikálására a farmakológián egyébként használt LC(-MS) módszerek a legtöbb esetben módosítás nélkül használhatók. Ezen felül az SPE töltetről való leoldáshoz „NMR-barát” deuterált oldószereket használhatunk, így a spektrum jóval kisebb része esik ki az oldószerelnyomás miatt (bár a minta koncentrációjától függően itt is szükség lehet az oldószer maradék jelének elnyomására). Emellett az LC-SPE alkalmazás lehetőséget kínál az oldószer alkalmas megválasztására, ami az oldószerspecifikus referenciaadatokat figyelembe véve megkönnyítheti a szerkezetfelderítést. Ezen túlmenően az LC-SPE-NMR elrendezés alkalmazásakor nem feltétlenül van szükség átfolyó küvetta alkalmazására a mérőfejben, a hagyományos 3-5 mm átmérőjű NMR csövekben is dolgozhatunk.

Ugyanakkor az extrakciós lépés beépítésével (ismeretlen komponens esetén nincs lehetőség a mindenre kiterjedő optimalásra) a keresett komponensből értékes anyagmennyiséget veszíthetünk (különösen erősen poláris metabolitok esetében), ami megnehezítheti a szerkezet felderítését. Emellett, amíg az on-line LC-NMR egyetlen injektálása során a „kromatográfiás szennyezésektől” (oszloptöltetről, eluensből dúsuló komponensek) származó jelek nem zavarják a keresett komponens jeleinek

azonosítását, addig a többszöri injektálás és extrakció miatt az LC-SPE minatelőkészítés során ezek a komponensek akár a keresett ismeretlenek mennyiségével összevethető mértékben dúsulhatnak fel, megnehezítve az NMR spektrumok kiértékelését.

6. Összefoglalás

A fentiekben igyekeztünk vázlatos képet nyújtani arról, hogy milyen sokrétű és komoly kihívásokkal teli elvárás támaszt a modern gyógyszeripar a kismolekulás oldatfázisú NMR spektroszkópiával szemben. Bemutattuk, hogy a Richter Gedeon Nyrt-ben működő NMR laboratórium hogyan próbál ezeknek a kihívásoknak megfelelni mind műszerezettség, mind munkafilozófia tekintetében. Bár az akadémiai szférában az igen nagy terejű NMR készülékeket leginkább biomolekulás kutatások céljára használják, igyekeztünk rámutatni arra, hogy gyógyszeripari környezetben az ilyen spektrométerek érzékenysége és felbontása egyrészt rendkívül hasznos a mindennapi rutin kismolekulás feladatok megoldásában, másrészt pedig gyakran elengedhetetlen ahhoz, hogy a cég a termékminőségre vonatkozó modern hatósági követelményeknek eleget tegyen, vagy hogy vitás szabadalmi kérdésekben piaci érdekeit érvényre tudja juttatni. Ezzel kapcsolatosan tárgyaltuk a „holisztikus” szerkezetkutatás, legfőképpen az NMR és a tömegspektrometria együttműködésének szükségességét is. Mindezt három valós példán keresztül illusztráltuk. Röviden tárgyaltuk továbbá az NMR alapú kötődésvizsgálatok jelenlegi lehetőségeit valamint az LC-NMR használatának előnyeit és korlátait valós gyógyszeripari körülmények között.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük a Szerkezetkutatási osztályon jelenleg dolgozó összes kollégánknak (Balogh Gábor, Dékány Miklós, Háda Viktor, Hevér Helga, Kóti János, Kiss Róbert, Kreutzné Kun Ibolya, Nagy Magdolna, Pallag Erika, Sánta Zsuzsanna, Sziki Erika), valamint minden korábbi munkatársunknak, hogy szorgos és lelkes munkájukkal hozzájárultak osztályunk valamint a Richter fejlődéséhez, továbbá köszönjük a Richter vezetésének a támogatást.

Hivatkozások

1. Batta, Gy. *Magy. Kém. Foly.* **2004**, 109–110, 127–135.
2. Szilágyi, L.; Kövér, K.; Batta, Gy.; Bányai, I.; Tóth, I. *Magy. Kém. Foly.* **2011**, 117, 133–141.
3. Bodor, A.; Farkas, V.; Harmat, V.; Jákl, I.; Karancsiné Menyhárd, D.; Stráner, P.; Perczel A. *Magy. Kém. Foly.* **2012**, 118, 159.
4. Sohár, P. *Magy. Kém. Foly.* **2004**, 109–110, 120–126.
5. Berger, S.; Braun, S. *200 and more NMR experiments*. Wiley-VCH: Weinheim, **2004**.
6. Szántay, Cs. Jr.; Demeter, Á. *NMR Spectroscopy. In: Identification and Determination of Impurities in Drugs*; Görög, S., Ed.; Elsevier: New York, **2000**; pp 109-143.
7. Szántay, Cs. Jr.; Béni, Z.; Balogh, G.; Gáti, T. *Trends. Anal. Chem.* **2006**, 25, 806–820.
8. Görög, S.; Szántay, Cs. Jr. *Spectroscopic methods in drug quality control and development. In: Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Elsevier: Oxford, **2010**; 2nd Ed., Vol. 3., pp 2640–2650.

9. Sánta, Zs.; Kóti, J.; Szőke, K.; Vukics, K.; Szántay, Cs. Jr. *J. Pharm Biomed Anal.* **2012**, *58*, 125–129.
10. Szántay, Cs. Jr. *Trends Anal. Chem.*, **1992**, *11*, 332–344.
11. Szántay, Cs. Jr.; Balogh, G. *Acta Pharm. Hung.* **2002**, *73*, 106–115.
12. Kovacs, H.; Moskau, D.; Spraul, M. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectr.* **2005**, *46*, 131–155.
13. Hajduk, P. J.; Greer, J. *Nature Rev. Drug. Disc.* **2007**, *6*, 211–219.
14. Batta, Gy.; Kövér, K.; Szántay, Cs. Jr., Eds. *Methods for structure elucidation by high-resolution NMR: Applications to organic molecules of moderate molecular weight. In Analytical Spectroscopy Library*, Elsevier, **1997**; Vol. 8, pp 1–357.
15. Demeter, Á.; Fodor, T.; Fischer, J. *J. Mol. Struct.* **1998**, *471*, 161–174.
16. Béni, Z.; Háda, V.; Dubrovay, Zs.; Szántay, Cs. Jr. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *69*, 106–124.
17. Dubrovay, Zs.; Háda, V.; Béni, Z.; Szántay, Cs. Jr. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.019>
18. Háda, V.; Dubrovay, Zs.; Lakó-Futó, Á.; Galambos, J.; Gulyás, Z.; Aranyi A.; Szántay, Cs. Jr. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, közlésre elfogadva.
19. Hajduk, P. J.; Burns, D. J. *Comb. Chem. HTS* **2002**, *5*, 613–621.
20. Stockman, B. J.; Dalvit, C. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectr.* **2002**, *41*, 187–231.
21. Lepre, C. A.; Moore, J. M.; Peng, J. W. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3641–3675.
22. Pellecchia, M. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 961–971.
23. Klages, J.; Coles, M.; Kessler, H. *Analyst* **2007**, *132*, 692–705.
24. Dalvit, C. *Drug Disc. Today* **2009**, *14*, 1051–1057.
25. Guo, C.; Zhang, D.; Tugarinov, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10872–10873.
26. Hajduk, P. J.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257–12261.
27. Dalvit, C.; Flocco, M.; Knapp, S.; Mostardini, M.; Perego, R.; Stockman, B. J.; Veronesi, M.; Varasi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7702–7709.
28. Wang, Y. S.; Liu, D.; Wyss, D. F. *Magn. Reson. Chem.* **2004**, *42*, 485–489.
29. Dalvit, C.; Fagerness, P. E.; Hadden, D. T. A.; Sarver, R. W.; Stockman, B. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7696–7703.
30. Dalvit, C.; Mongelli, N.; Papeo, G.; Giordano, P.; Veronesi, M.; Moskau, D.; Kümmerle, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13380–13385.
31. Dalvit, C.; Gossert, A. D.; Coutant, J.; Piotto, M. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 199–202.
32. Meyer, B.; Peters, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864–890.
33. McCoy, M. A.; Senior, M. M.; Wyss, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7978–7979.
34. Ji, Z.; Yao, Z.; Liu, M. *Anal. Biochem.* **2009**, *385*, 380–382.
35. Marquardsen, T.; Hofmann, M.; Hollander, J. G.; Loch, C. M. P.; Kühne, S. R.; Engelke, F.; Siegal, G. *J. Magn. Reson.* **2006**, *182*, 55–65.
36. Früh, V.; Zhou, Y.; Chen, D.; Loch, C.; Eiso, A. B.; Grinkova, Y. N.; Verheij, H.; Sligar, S. G.; Bushweller, J. H.; Siegal, G. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 881–891.
37. Yanamala N.; Dutta, A.; Beck, B.; van Flett, B.; Hay, K.; Yazbak, A.; Ishima, R.; Doemling, A.; Klein-Seetharaman, J. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2010**, *75*, 237–256.
38. Meinecke, R.; Meyer, B. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3059–3065.
39. Claasen, B.; Axmann, M.; Meinecke, R.; Meyer, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 916–919.
40. Assadi-Porter, F. M.; Tonelli, M.; Maillet, E.; Hallenga, K.; Benard, O.; Max, M.; Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7212–7213.
41. Kemper, S.; Patel, M. K.; Errey, J. C.; Davis, B. G.; Jones, J. A.; Claridge, T. D. W. *J. Magn. Reson.* **2010**, *203*, 1–10.
42. Auer, R.; Kloiber, K.; Vavrinska, A.; Geist, L.; Coudevylle, N.; Konrat, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1480–1481.
43. Mizukoshi, Y.; Abe, A.; Takizawa, T.; Hanzawa, H.; Fukunishi, Y.; Shimada, I.; Takahashi, H. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1391–1394.
44. Post, C. B.; *Current Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 581–588.
45. Rademacher, C.; Guiard, J.; Kitov, P. I.; Fiege, B.; Dalton, K. P.; Parra, F.; Bundle, D. R.; Peters, T. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 7442–7453.
46. Sánchez-Pedregal, V. M.; Reese, M.; Meiler, J.; Blommers, M. J. J.; Griesinger, C.; Carlomagno, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4172–4175.
47. Watanabe, N.; Niki, E. *Proc. Jpn. Acad. Ser B* **1978**, *54*, 194–199.
48. Bayer, E.; Albert, K.; Nieder, M.; Grom, E.; Keller, T. *J. Chromatogr. A* **1979**, *186*, 497–507.
49. Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Wilson, I. D. *J. Chromatogr. B* **2000**, *748*, 233–258.
50. Albert, K., Ed. *On-line LC-NMR and related techniques*. Wiley, **2002**.
51. Singh, S.; Handa, T.; Narayanam, M.; Sahu, A.; Junwal, M.; Shah R. P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *69*, 148–173.
52. Griffiths, L. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4091–4095.
53. Elipe, M. V. S. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *497*, 1–25.

The role and applicability of NMR spectroscopy in the modern pharmaceutical industry

For most chemists NMR spectroscopy is traditionally associated with its classical role of supporting synthetic chemistry projects. Outside of the pharmaceutical industry it is rarely known or appreciated however, that even if we disregard the more recent pharmaceutical uses of NMR such as biomolecular investigations, fragment-based drug design or metabonomics, the role of NMR in small-molecule structure determination is vastly more complex and important than that. It is also little known that the fiercely competitive business environment of the pharmaceutical industry as well as the tough regulatory demands place increasing pressures on the performance of NMR. Given the hugely expensive nature of high-end NMR instruments, the extent to which any given pharma company should, or would, allocate NMR resources to its own R&D projects or to its quality-control system, is not at all inherently obvious.

As NMR spectroscopists of the Spectroscopic Research Department of Gedeon Richter Plc. we are privileged in that Richter owns the

most powerful NMR instrumentation in the region, and in that our department works within a unique organizational framework along the lines of a special working philosophy. Based on the experiences and conceptual insights that we have gained within this working environment over the years, in this article we discuss the manifold industrial uses of NMR in liquid-phase small-molecule structure elucidation, and we explain the reasons why, in that capacity, high-end NMR instruments are playing an increasingly important role in the industry, particularly with regard to medicinal chemistry and the impurity profiling of drug substances. We also give a brief outline of the reasons why we advocate a „holistic” approach to NMR and MS-based structure elucidation, meaning that acquiring all the necessary NMR data needed for a full ¹H and ¹³C (¹⁵N) assignment together with high-quality MS data for each investigated sample has both short- and long-term benefits in both a scientific and business context. We provide three real-life examples that illuminate the above concepts. Additionally, we briefly discuss the use of NMR in ligand-receptor investigations and the feasibility of using LC-NMR for the identification of drug impurities, degradants and metabolites.

A gyors folyadékkromatográfia jelenlegi lehetőségei

FEKETE Jenő^{a*} és FEKETE Szabolcs^b

^aBME Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék 1111. Budapest, Szent Gellért tér 4.

^bPost-doctorant, Université de Genève Pavillon des Isotopes - I-3

1. Bevezetés

A folyadékkromatográfia hosszú ideig csipkerózsika álmát aludta. Az 1970-es évek közepére alakult ki a műszerezettség. Ez a műszerezettség visszatükrözte az arra az időre elért eredményeket a kolonnatechnológia területén. Ekkora már megjelentek a 10 µm szemcseátmérőjű töltetek, a szabálytalan alakú szilikagél helyét fokozatosan átvették a szabályos, gömbszimmetrikus töltetek. A kolonna méreteket tekintve uralkodóvá a 15 és 25 cm hosszú és 4,6 mm belsőátmérőjűek váltak. A folyadékkromatográfia műszerezettségét is ezekhez igazították. Ennek megfelelően az adagolási térfogat 10-100 µl közé esett, az UV, UV-VIS detektorok cellatérfoga 10 µl, az összekötő vezetékek belső átmérője 0,25 mm. Az így kialakított készülék alapjaiban teljes mértékben megfelelt a követelményeknek. Hosszú ideig csak a számítógépes vezérlés és adatgyűjtés jelentette a fejlesztést. Ez a rendszer a gyógyszeripar fő analitikai módszerévé vált. A technikát nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiának nevezték el (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). A kolonna töltetek, amelyek döntő többségét a szilikagél alapúak jelentették, viszont nagy fémion tartalmúak voltak, a nagy szilanolcsoport aktivitás és a kis borítottságuk miatt számos feladat megoldásnál nehezen reprodukálhatóvá tették a módszereket. Sokszor sarzsról-sarzsra változott a kolonnák felületi fizikai-kémiaja és ez visszaköszött az elválasztásokban is. Ekkor a fő feladatot a kolonnatechnológia fejlesztése jelentette.

Kisebb fémion tartalmú, kisebb szilanolcsoport aktivitású, jól borított állófázisok és sarzsról-sarzsra való azonosság jelentették a fő célokat. A 90-es évek végére a 2000-es évek elejére, a kolonnatechnológia területén sikerült a fő célokat elérni, sőt megjelentek az 5 µm alatti szemcseátmérőjű töltetek, először a 3 µm-esek majd napjainkra, a 2 µm-esek és az alatti szemcseátmérőjűek is. A kis csúcshélesség, amelyet a kis szemcseátmérőjű töltetekkel lehet elérni, jelentősen megnövelte a technika hatékonyságát. Értve ez alatt, hogy kis szerkezeti különbségű anyagokat lehetett rövid idő alatt elválasztani, egységnyi idő alatt viszonylag nagyszámú mintát lehetett elemezni, megnőtt a kolonna csúcshélesség kapacitása. Hagyományos HPLC technikánál a felső nyomás határ, a készülék maximális teljesítménye 400 bar. Ma amikor HPLC-ről beszélünk ezzel a műszerezettséggel működő folyadékkromatográfias rendszert értjük alatta. Ezt a műszerezettséget alkalmazva az elemzési idő általában 5-60 perc közé esett, az elválasztásokban tapasztalt csúcshélességek nagyok voltak. Adva volt ezzel a fő feladat, csökkenteni a kromatográfias csúcsok szélességét, azaz növelni a kinetikai hatékonyságot. A megoldásra több út kínálkozott, az egyik csökkenteni a kolonna szemcseméretet, a másik növelni a hőmérsékletet, a harmadik pedig új, nagyobb permeabilitású kolonnákat

készíteni. Ez a harmadik megoldás vezetett el egyrészt a monolit kolonnához, másrészt a héjszerű töltetek bevezetéséhez. Ennek az összeállításnak is középpontjába ezek az új kolonnatechnológiák állnak: nevezetesen a 2 µm szemcseátmérő alatti teljesen porózus, a 3 µm szemcseátmérő alatti héjszerű töltetek, kiegészítve a gyorsfolyadékkromatográfia nagyhőmérsékletű ágával. A 2 µm teljesen porózus, a 3 µm szemcseátmérő alatti héjszerű töltetek, a monolit kolonnák és a nagy hőmérséklet alkalmazása megköveteli, hogy új készüléket használjunk. Az új kolonnatechnológiával és műszerezettséggel végrehajtott elválasztásokat, megkülönböztetve a hagyományos HPLC technológiától, továbbiakban ultra nagyhatékonyságú vagy ultra nagynyomású folyadékkromatográfiának (Ultra High Performance/Pressure Liquid Chromatography, UHPLC) nevezzük összefoglaló néven. A cikk tárgyalja a gyors folyadékkromatográfiával kapcsolatos elméleti megközelítéseket, azok gyakorlatba való átültetését.

2. Folyadékkromatográfias elválasztások gyorsítása

A gyors folyadékkromatográfias módszereknél a következő problémákkal állunk szemben: vajon a kisméretű kolonnák alkalmazása megengedi-e az eddig hagyományosnak tekintett nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias rendszerek használatát (HPLC). Értve ez alatt, hogy az adagolt minta mennyisége és térfogata ugyanolyan határok között változhat-e, a megszokott műszer konfiguráció alkalmas-e, hogy mindazokat az előnyöket kihasználjuk, amelyeket ezek a kis térfogatú kolonnák nyújtanak. Először is nézzük meg, hogy milyen előnyöket adnak ezek a nagy hatékonyságú és kis térfogatú kolonnák. A szakirodalom elsődlegesen a kis szemcseátmérőt hangsúlyozza, holott a kis térfogat szorosan összefügg a gyorsasággal és a zóna maximumban mért koncentrációval is. A kisebb holtterefogat kisebb komponenshígulást jelent, amely eredménye a jobb kimutatási határ, vagy másképpen a nagyobb érzékenység. A gyorsaság megítéléséhez a következő alapösszefüggésből kell kiindulnunk:

$$t_r = t_0(1 + k) \quad (1)$$

A kifejezésben t_r a bruttó retenciósidőt jelenti, a t_0 a holtidő vagy hold-up idő, a k a visszatartási tényező, vagy retenciósfaktor.

$$t_0 = \frac{L}{u} \quad (2)$$

ahol az L a kolonna hossz és az u a lineáris áramlási sebesség. Az 1-t, a 2-be helyettesítve kapjuk:

* Fekete Jenő Tel.: +36/1/4631596 ; fax: ; e-mail: feketje@mail.bme.hu

$$t_r = \frac{(1+k)L}{u} \quad (3)$$

Az összefüggésből egyértelműen kiderül, hogy az elemzési idő csökkentésének két útja van: vagy a kolonna hossz nagymértékű csökkentése, vagy a lineáris áramlási sebesség növelése. A k érték csökkentése nem lehetséges, mert akkor az interferencia veszély, azaz, hogy két romatográfiás csúcspont eluálódjon jelentősen megnő. A hagyományos kolonna hosszak 10-25 cm között változnak. Ezeket a kolonnákat a hagyományos HPLC készülékekben a megengedett kolonnán kívüli zónaszélesedéssel használhatjuk. Amennyiben a kolonnahosszakat 2-5 cm-re csökkentjük, akkor kb. ötödére csökken az elemzési idő. Ezzel ugyan a gyorsasági kritérium teljesül, mert az elemzési időt ötödére csökkentettük, de ez együtt jár a felbontás csökkenésével, hiszen a kinetikai hatékonyság az elérhető tányérszámok a kolonna hosszától függenek. Ahhoz, hogy ne változzon az elválasztás minősége, a kisméretű kolonnák kinetikai hatékonyságát meg kellett növelni. Az elválasztás úgy is gyorsítható, ha megnöveljük a mozgófázis sebességét. A lineáris áramlási sebesség növelése fordított arányban áll az elemzési idővel.

2.1. Teljesen porózus, kis szemcseátmérőjű töltetek

Szemcsés töltetek esetén a kinetikai hatékonyságot elsősorban a szemcseátmérő csökkentésével növelhetjük. Ez könnyen belátható, ha az általános tányér-egyenletet hívjuk segítségül. Először van Deemter és kollégái mutatták meg, hogy az elméleti tányérmagasság a lineáris sebesség függvényében egy minimumos görbével írható le.¹ Az általuk bevezetett függvény általános alakja a következő volt:

$$H = a + \frac{b}{u} + cu \quad (4)$$

Az egyenletben H az elméleti tányérmagasság, a az örvénydiffúzióra, b a hosszirányú diffúzióra és c az anyagátadási ellenállásra jellemző együtthatók. Ezt az alapegyenletet azóta sokan tovább fejlesztették (Giddings, Knox, Golay, Hubert, Horváth, Myabe, Guiochon...), az eredeti van Deemter által leírt forma csak egy közelítés. Ha szemléltetni akarjuk a szemcseátmérő és diffúziós tulajdonságok hatását az elválasztás hatékonyságára, akkor U.D. Neue szerint a következő egyszerűsített formát írhatjuk fel:²

$$H = A \cdot d_p + \frac{B \cdot D_M}{u} + C \frac{d_p^2 \cdot u}{D_M} \quad (5)$$

Ahol d_p a töltet szemcseátmérőjét jelenti, D_M pedig az adott komponens diffúziós állandóját. Hangsúlyozzuk, hogy az 5-egyenlet sok elhanyagolást tartalmaz (pl. a diffúziós állandó nem azonos a szemcsék közötti folyadék fázisban és a szemcsén belüli stagnáló folyadékban, vagy az örvénydiffúzió a valóságban nem független a lineáris sebességtől, illetve az egyenlet nem különbözteti meg az anyagátadás álló- illetve mozgófázis járulékat) de első közelítésben jól szemlélteti, hogy az örvénydiffúzió egyenesen arányos a szemcseátmérővel, míg az anyagátadási tag a szemcseátmérő négyzetétől függ. Az egyenletből egyértelműen következik,

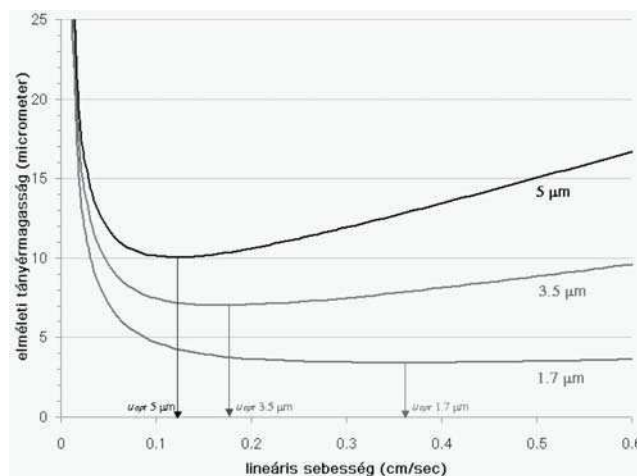
hogy a szemcseátmérő csökkentése jelentős tányérmagasság csökkenést (tányérszám növekedést) eredményez. Másik következmény, hogy az egyenlet által leírt görbe minimum helye a nagyobb lineáris sebességi tartományba tolódik, ha a szemcseátmérőt csökkentjük. A függvény optimum (minimum) helye ott van ahol a $dH/du=0$ teljesül. Ekkor az optimális lineáris sebesség (u_{opt}) a következők szerint írható le:

$$u_{opt} = \frac{\sqrt{D_M}}{d_p} \sqrt{\frac{B}{C}} \sim \frac{1}{d_p} \quad (6)$$

Tehát a lineáris sebesség optimuma fordítva arányos a szemcseátmérővel. A 6 egyenletet 5-be helyettesítve megkapjuk a tányérmagasság minimum értékét (H_{min}):

$$H_{min} = d_p (A + 2\sqrt{CB}) \sim d_p \quad (7)$$

Azaz az elérhető legkisebb tányérmagasság (legnagyobb tányérszám) egyenesen arányos a töltet szemcseátmérőjével. Láthatjuk, hogy a szemcseátmérő csökkentés előnyös az elválasztás gyorsítása és a kinetikai hatékonyság fokozása szempontjából is. Az 1 ábra mutatja a szemcseátmérő hatását a $H-u$ görbe lefutására.



1. Ábra. Az elméleti tányérmagasság minimumának és a lineáris sebesség optimumának változása a különböző szemcseátmérőjű töltetekkel.

Folyadékkromatográfiás körülmények között, ahol a lineáris áramlási sebességek kicsik, az áramlás lamináris jellegű. Ekkor a nyomásesést a kolonnán a Darcy törvény írja le.

$$\Delta p = \frac{\Phi \eta L u}{d_p^2} \quad (8)$$

ahol a Φ a kolonna áramlási ellenállása, egyes szerzők szerint értéke 500 és 1000 között van és η a mozgófázis viszkozitása. Tehát a szemcseátmérő csökkenésével, a kolonnán létrejövő nyomásesés négyzetesen növekszik. A különböző cégek által forgalmazott azonos átlagos szemcseátmérőjű kolonnákon a nyomásesés eltérő lehet. Ennek két oka lehetséges, a nagyobb nyomásesésű kolonnán a szemcseátmérő eloszlás szélesebb, és a kisebb szemcseátmérőjűből több van, vagy pedig a töltés során a szemcsék sérülnek és a kis szemcseátmérőjű törmelék elzárja az áramlási csatornákat. Itt kiegészítjük azzal, hogy különbséget kell tenni a hagyományos HPLC-

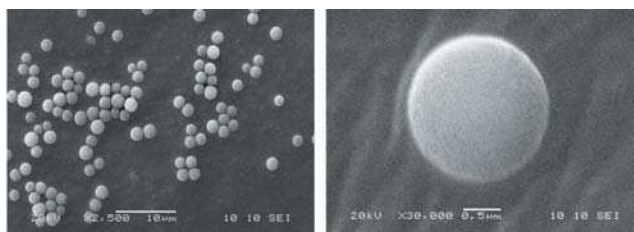
re tervezett töltetek és az ultra nagynyomásra tervezett töltetek között. A töltési nyomásnak, ugyanis nagyobbak kell lenni, mint a használatkor mért vagy esetünkben a megengedett legnagyobb nyomásnak. A hagyományos HPLC készüléknél ez a felső nyomás 400 bar, az ultra nagynyomású készülékeknél (UHPLC) ez ma 1000-1300 bar. Könnyű belátni, hogy annak az esélye, hogy a szemcsék sérülnek annál nagyobb, minél nagyobb a töltési nyomás. Önmagában véve a 10 nm porus átmérőjű szilikagélek többsége bírja a 400 bárnál nagyobb nyomásokat is. A hagyományos HPLC-re tervezett töltetknél a kolonna töltési nyomás kisebb, mint 1000 bar. Így lehetséges, hogy a gyártók a 2 μm szemcséátmérőjű tölteteket ajánlják a hagyományos készülékekhez gyors kromatográfiai módszerek alkalmazására. Ennek azonban vannak feltételei. Nyomásesés oldalról az, hogy a mozgófázisnak kis viszkozitásúnak kell lennie. Ezért kerülnek előtérbe az acetonitril tartalmú mozgófázisok szemben a metanol tartalmúakéval. Gradienselúció alkalmazásakor nagy víz tartalmú oldószerből indulva a metanol tartalom függvényében maximumos görbével írható le a viszkozitás változása. A görbe maximumát kb. 50 tf. % víz-metanol elegynél éri el. Ekkor kb 1,5-ször nagyobb a viszkozitás, mint a kiindulási mozgófázisnál volt. Acetonitril-víz elegynél a hatás sokkal kisebb, szobahőmérsékleten a maximális viszkozitás alig haladja meg az 1 cP-t. Így a nyomásesés még a legkedvezőtlenebb körülmények között is kb. 50 %-kal kisebb, mint a metanol-víz elegynél mért. A nagy viszkozitású mozgófázisok másik hátránya, hogy az agyagátadási ellenállást (lásd: 4 és 5 egyenlet) kedvezőtlenül befolyásolják. Ennek eredményeként a lineáris sebesség növelésével lényegesen romolhat az elválasztás hatékonysága (meredekebb felszálló ág a *H-u* görbék – pl. van Deemter típusú - nagy lineáris sebességű tartományában).

A sebesség növelésének határt szab a készülék maximális nyomás teljesítménye. Mára a hagyományosnak tekinthető nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában (HPLC) ez 400 bar (6000 psi). Ma már szinte minden készülégyártó forgalmaz UHPLC készüléket, amelyek 1000-1300 bar tartományig is képesek a mozgófázist szállítani. Az UHPLC-s elválasztások hatékonyságát két hatás külön-külön vagy együttesen is leronthatja. Az első hatás abból ered, hogy a nagy nyomással bevitt energia hővé alakul, amely eredményeképp hossz- és keresztirányú hőmérséklet gradiens alakul ki a kolonnán. Ezek következménye elsősorban káros csúcshévesedés, illetve a retenció tulajdonságok megváltozása.³ A hőátadás a környezetnek a kolonna átmérőtől függ, minél kisebb a kolonna átmérő annál nagyobb az egységnyi kolonna-térfogatra jutó hőátadó felület. Ebből következik, hogy ekkor inkább a 2 mm körüli vagy az alatti kolonnák alkalmazása teszi lehetővé, hogy ne alakuljanak ki olyan hőmérséklet különbségek, amelyek jelentős csúcshévesedést okoznak (sűrűlási hőeffektusok). Ekkor viszont előtérbe kerülnek a kolonnán kívüli zónaszélesítő hatások, és az abból eredő készülék problémák. A kis kolonna hosszhoz, tehát kis belsőátmérő kell, hogy tartozzon.

Egybevetve az eddigieket megállapítható, hogy gyors folyadékkromatográfiát teljesen porózus töltetekkel kis szemcséátmérővel és kis kolonna térfogattal lehet

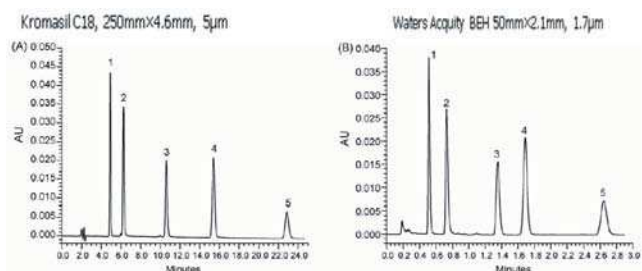
megvalósítani. Egyik lehetséges megoldás, hogy a 3 összefüggés értelmében a kolonna hosszát csökkentjük és ekkor a hagyományosnak mondott HPLC (400 bar) is alkalmazható, vagy a készülék nyomás teljesítményét növeljük meg ahhoz, hogy a lineáris áramlási sebességet ne kelljen csökkenteni, esetleg növelni lehessen. Az első esetben jó kompromisszumnak tűnik, ha a szemcséátmérőt 3 μm körül tartjuk, a második esetben alkalmazhatjuk, az ún. szub-2 mikron szemcséátmérőjű tölteteket.

2004 mérföldkö volt a folyadékkromatográfia történetében. Ekkor a Waters cég piacra dobta az első 1000 bar-ig (15 000 PSI) működő – és kis kolonnán kívüli térfogatú - gyors folyadékkromatográfját. Ezt UPLC-nek nevezte el, amely az ultra performance liquid chromatograph betűszava. Ezzel egy időben 1,7 μm átlagos szemcséátmérőjű szerves és szervetlen szilánból (brigde ethylene hybrid, BEH) készült teljesen porózus állófázissal töltött kolonnákat is forgalomba bocsátottak.^{4,5} A szemcse elektronmikroszkopos képét a 2. ábrán adtuk meg.⁶



2. Ábra. Az 1,7 μm -es Waters Acquity BEH szemcse elektronmikroszkopos képe.

A szemcse teljesen gömbszimmetrikus, a felületén nincsenek kiugrások vagy mélyedések. Ez több szempontból is fontos, egyrészt a mechanikai stabilitás miatt, másrészt a szemcsét körül vevő álló folyadékfilm okozta zónaszélesedés kisebb (film diffúzió). A töltet szemcséátmérő eloszlása is szűkebb a hagyományos HPLC-es töltetekhez képest. A szakirodalomban jelenleg is vita van a szemcséátmérő eloszlás szerepéről, elsősorban a kinetikai hatékonyságra gyakorolt hatásáról (örvény diffúzió, töltet sűrűség, töltési tulajdonságok), műveleti szempontból előnyös a kis szemcséátmérő eloszlás.⁷ Wang és mtsai az elsők között mutatták be, hogy a hagyományos HPLC-s módszerek (25 cm-es, 5 μm -es kolonna, 400 bar nyomás) analízis ideje akár a hetedére is csökkenthető 5 cm-es 1,7 μm -es BEH kolonnát és 900-1000 bar nyomást alkalmazva.⁸ A 3. ábrán egy hagyományos módszer gyors módszerre transzferálását láthatjuk.⁸



3. Ábra. Egy izokratikus hagyományos HPLC elválasztás UHPLC-s felgyorsítása. (gyógyszerhatóanyagok elválasztása).

A Waters BEH 1,7 μm -es töltet sikere után hamarosan más gyártók is forgalomba hoztak 2 μm -es vagy az alatti

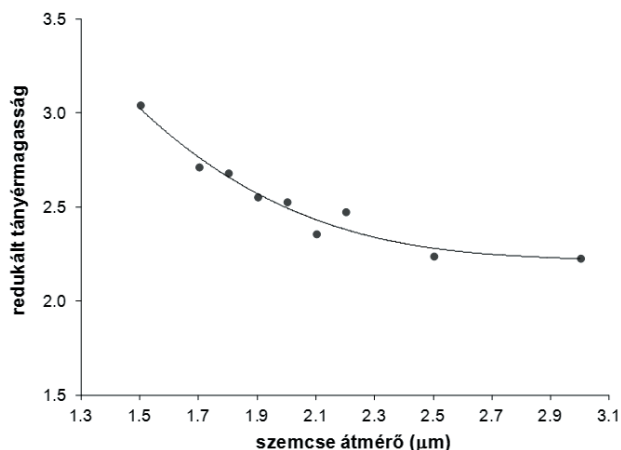
töltetüket. Először az Agilent Zorbax RHD 1,8 μm -es, a Thermo Hypersil Gold 1,9 μm -es majd a Grace Vision HT 1,5 μm -es töltetei jelentek meg. Mára már minden kolonna gyártó cég ajánlja a saját teljesen porózus UHPLC-s töltetét. Az 1. táblázat a 2011-ig kereskedelmi forgalomban megjelent 2 μm és az alatti tölteteket foglalja össze.⁹

1. Táblázat. Kereskedelmi forgalomban megjelent (2011-ig) 2 μm -es és az alatti töltetek.

gyártó	kolonna/termék neve	névleges szemcseátmérő (μm)
Alltech (Grace Davison)	VisionHT	1,5
Shant Laboratories	Pathfinder	1,5
Fortis Technologies	Fortis 1.7	1,7
Orachem Technologies	Emerald, Epitomize	1,7
Phenomenex	Luna, Kinetex	2,0, 1,7
Sepax	GP-8 and GP-18	1,7
Waters	Acquity BEH, CSH	1,7
Agilent Technologies	Zorbax Rapid Resolution HT/HD	1,8
Bischoff	ProntoPEARL TPP Ace-EPS	1,8
ES Industries	Epic Sub-2	1,8
Knauer	BlueOrchid	1,8
Macherey-Nagel	Nucleodur	1,8
MicroSolv Technology	Cogent Diamond & Silica-C	1,8
Micro-Tech Scientific	Microsil	1,8
Perkin Elmer	BrownLee	1,9
Restek	Pinnacle DB/ Ultra II	1,9
Thermo	Hypersil Gold	1,9
Varian	Pursuit UPS	1,9
Agela Technologies	Rapid aSB	2,0
Hitachi	LaChromUltra	2,0
Imakt	Presto	2,0
Shiseido	Capcell Pack	2,0
Tosoh Haas	TSKgel SuperODS	2,0
YMC	Ultra-Fast	2,0
Zirchrom	Zirchrom	2,0

Azt azért megjegyezzük, hogy ugyan a 2 μm alatti töltetek abszolút értékben igen jó tányérmagasságokat (H_{min}) valósítanak meg, de az ún. redukált tányérmagasság ($h=H/d_p$) minimuma, ezekkel a töltetekkel elmarad a 3-5 μm -es töltetekhez képest. A redukált tányérmagasság egy dimenziómentes mérőszám (Giddings vezette be), amivel a különböző szemcseméretű kolonnák hatékonyságát vehetjük össze függetlenül a szemcsemérettől. Elmélet szerint egy jól töltött teljesen porózus töltetű kolonnának $h=2-2,5$ közötti

redukált tányérmagasság minimumot kellene adnia. Sok esetben a szemcseátmérő és redukált tányérmagasság között fordított arány figyelhető meg (4. ábra).¹⁰ Ez azt jelenti, hogy a 2 μm alatti töltetek hatékonysága a gyakorlatban elmarad az elméletileg elvárhatótól ($h_{min} \sim 3$). Ennek több oka lehet, 1) a már említett hőeffektusok 2) kolonna töltési problémák illetve 3) a káros oszlopon kívüli térfogatok is nagyban leronthatják a kolonnák hatékonyságát.

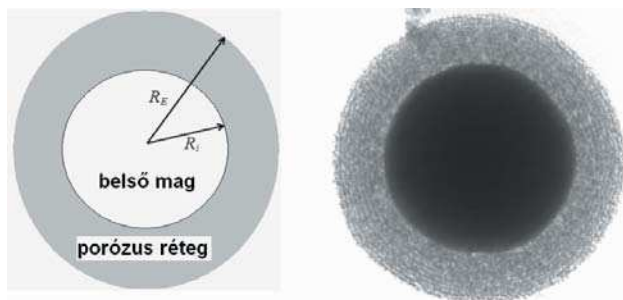


4. Ábra. A redukált tányérmagasság minimum értékének változása a töltet szemcseátmérő függvényében. Ez esetben a csúcsszélesedéseket korrigáltuk az oszlopon kívüli csúcsszélesedésre illetve fontos megjegyezni, hogy a töltetek/kolonnák különböző gyártóktól származnak.

2.2. Héjszerkezetű (mag-héj) töltetek

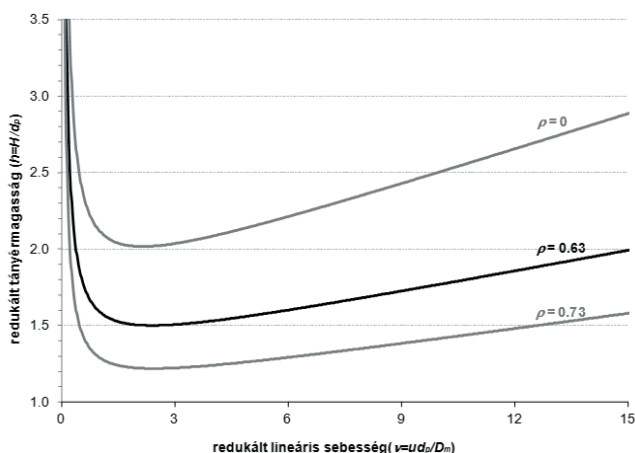
A zónaszélesedés csökkentésének másik megoldása, ha a diffúziós úthosszat rövidítjük. Ez hozta el a héjszerű töltetek jelenlegi reneszánszát. Horváth és Kirkland közel negyven éve bevezette ezeket a tölteteket, amelyeket, akkor pellikularisnak neveztek.¹¹⁻¹³ Horváthék először a 60-as évek legvégén, 50 μm üvegyöngyöt használtak, amelyet 1 μm szerves polimer alapú ioncserélővel vettek körül. Utána Kirkland volt az, aki 30-40 μm átmérőjű töltetet készített 1 μm -es aktív réteggel. Az ilyen típusú tölteteknek az anyagátadási ellenállása jobb, mint a hasonló méretű teljesen porózus tölteteknek. Ez a töltet azonban nem lett népszerű a folyadékromatográfiás társadalomban, mert a teljesen porózus szilikagél alapú töltetfejlesztés vált döntővé és megjelentek a 10, 5 később a 3 μm szemcseátmérőjű teljesen porózus töltetek. A kezdeti sikertelenség oka a nagy inaktív mag (az aktív réteghez képest), aminek a következménye a kolonnák kis terhelhetősége és a visszatartása csökkenése volt. 2007-ben újból megjelentek ezek a töltetek (harmadik generáció), amikor a szemcseátmérő már kisebb volt 3 μm -nél. Ez óriási áttörést hozott a gyors folyadékromatográfiában. Az első 2,7 μm -es héjszerkezetű töltetek Halo és Ascentis Express néven kerültek kereskedelmi forgalomba, s ismét Kirkland volt az, aki bevezette.¹⁴

Kezdetben, az alap koncepció az volt, hogy makromolekulák elválasztásának hatékonyságát javítsák úgy, hogy a csökkentett diffúziós úthossz következtében felgyorsulnak a szemcsén belüli anyagátadási folyamatok. Ezt úgy lehet elérni, hogy a töltet tartalmaz egy nem porózus magot és ezt veszi körül az elválasztásban szerepet játszó aktív porózus réteg. Az 5. ábra a héjszerkezetű töltetek sematikus képét mutatja.



5. Ábra. Héjszerkezetű töltetek sematikus képe (balra), illetve elektronmikroszkópos felvétele (jobbra).

Az új generációs héjszerkezetű töltetek kis szemcseméretéből adódik az előnyös örvény- és tengelyirányú diffúziós tulajdonság, a vékony porózus réteg következtében pedig gyorsabb részecskén belüli anyagátadás és kedvezőbb hosszirányú diffúzió várható. Kaczmarski és Guiochon levezetései alapján, a részecskén belüli diffúziósebesség a belső mag átmérő és a teljes szemcse átmérő hányadosának (ρ) függvényében leírható.¹⁵ Ahogy ez az arány növekszik ($\rho=1$ megfelel a nem-porózus töltetnek, míg $\rho=0$ a teljesen porózusnak) úgy válik egyre gyorsabbá az anyagátadási kinetika az aktív héjban (van Deemter összefüggés C tagja, nevezetesen az állófázis járuléka). Ez az előnyös tulajdonság elsősorban a nagy lineáris sebességeknél jelentkezik. Másrészt a hosszirányú diffúzió is csökkennie kell az inert belső mag miatt (van Deemter összefüggés B tagja). Ennek elsősorban a kis lineáris sebességi tartományban van jelentősége. Az általános sebességi elméletből az is levezethető, hogy az anyagátadás mozgófázis járuléka is függ közvetve a héj-vastagságtól (mert a visszatartás csökken a rétegvastagság csökkentésével).¹⁶ Az elméleti levezetések szerint körülbelül 2,3-szor illetve 1,7-szer gyorsabb részecskén belüli anyagátadás várható a kereskedelmi forgalomban kapható 2,6 és 2,7 μm -es héjszerkezetű töltetekkel (Kinetex and Halo/Ascentis Express/Poroshell-120, $\rho = 0.73$ és $\rho = 0.63$), mint az azonos méretű teljesen porózus töltetekkel. A 6. ábra néhány elméleti h - v görbét mutat (v a redukált lineáris sebesség) azonos szemcseátmérőjű, de különböző szerkezetű töltetekre.⁹



6. Ábra. Számolt h - v görbék teljesen porózus és héjszerkezetű töltetekre. Feltételezett mozgófázis összetétel: 50% acetonitril-50% víz, komponens molekulatömege 1000 g/mol.

A 6. ábra mutatja, hogy teljesen porózus töltetekkel kb. $h_{\min} = 2.0$, míg a jelenlegi héjszerkezetű töltetekkel $h_{\min} = 1.2$ -

1,5 körüli redukált tányérmagasság minimum várható. Meg kell jegyeznünk, hogy az irodalomban található rendkívül jó hatékonysági adatok kromatográfiásan kis molekulákra, nem magyarázhatóak a jelenlegi elméletekkel. Több szerző is lényegesen kedvezőbb örvény diffúziós tulajdonságot (van Deemter összefüggés A tagja) figyelt meg a héjszerkezetű töltetekre, mint a teljesen porózusokra. Elvileg a szemcse szerkezetnek nem kellene hatással lennie az örvénydiffúzióra, de most úgy tűnik, hogy ez lehet az oka a rendkívüli jó hatékonyságnak a kismolekulás elválasztásokra. Van, aki a héjszerkezetű töltetek kitűnő szemcseméret eloszlásával, van aki pedig a viszonylag gömbös felülettel és az ennek köszönhető jobb kolonna töltési tulajdonságokkal (homogénebb töltetágy) magyarázza a jelenséget.^{17,18} Jelenleg a héjszerkezetű töltetek reneszánszukat élik, remek hatékonyságot produkálnak mind kis, illetve makromolekulák elválasztásakor.

Az eddig tárgyalt előnyök mellett néhány hátrányos tulajdonságot is meg kell említeni. A vékony aktív porózus réteg miatt könnyen belátható, hogy azonos méretű teljesen porózus töltetnél képest kisebb terhelhetőség és kisebb visszatartás várható a héjszerkezetű töltetekkel. Kísérleti adatok alapján, az új generációs héjszerkezetű töltetek terhelhetősége nagyjából megegyezik a 2 μm -nél kisebb teljesen porózus töltetével.^{19,20} Az is bebizonyosodott, hogy a visszatartás csökkenése a jelenlegi $\rho=0,6-0,8$ szemcse szerkezet esetén még nem kritikus.²¹ Elsősorban $\rho > 0,8$ szemcse szerkezet esetén (pl. Aeris WP töltet) válik jelentősé.

Mára már szinte minden töltet-gyártó forgalmaz új generációs héjszerkezetű állófázisokat. Először a 2-3 μm szemcseátmérő közötti töltetek jelentek meg, amelyeknél a héj vastagsága 0,35-0,50 μm között volt (Halo, Ascentis Express, Poroshell, Kinetex). Érdekes, hogy ezen töltetek átlagos pórus átmérője 90-100 Å közötti volt, holott a héjszerkezetű töltetek, elmélet szerint makromolekulákra teljesítenek a legjobban. Mára már megjelentek a 160, 200 és 300 Å körüli héjszerkezetű állófázisok is (Halo Peptide ES, Aeris WP...), amelyek remek hatékonysággal alkalmazhatók fehérje elválasztásokban.^{20,21} A 2. táblázatban a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható új generációs héjszerkezetű tölteteket foglaltuk össze. Nemrégiben a 2 μm alatti és a 3-5 μm közötti töltetek is megjelentek. Az előbbieket hihetetlen, eddig sosem tapasztalt kinetikai hatékonyág elérésére teszik képessé az alkalmazót, az utóbbiakat pedig elsősorban a hagyományos HPLC-s töltetek (3-5 μm teljesen porózus) helyettesítésére javasolják a gyártók.

2.3. Monolit kolonnák

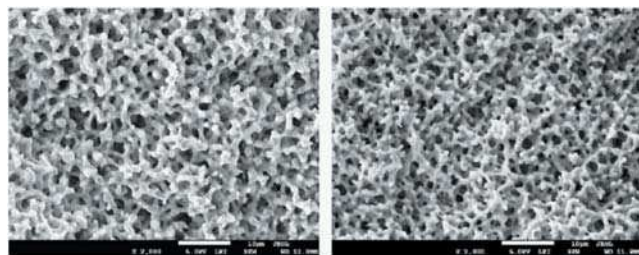
A monolit eredeti jelentése nagy kő. Kromatográfiás szempontból ez annyit jelent, hogy egyetlen polimer adja a kolonnát, amelyben két fajta pórus található (szilikagél alapú monolitok estén). A nagyobbik pórus átmérője 1-3 μm , ezt nevezzük átfolyó pórusnak, míg a szilárd polimerben található a mezopórusok, amelyek a komponensek megkötődését biztosítják. A kereskedelmi forgalomban, mind szerves polimer, mind szilikagél alapú monolit kolonnák kaphatók. Mi továbbiakban csak a szilikagél alapúakkal foglalkozunk. Rövid történeti áttekintés kedvéért néhány ezen a területen tevékenykedő szakembert sorolunk fel. Úttörő munkát végzett ezen a területen Hjertén, Svec,

2. Táblázat. Kereskedelmi forgalomban megjelent új generációs héjszerkezetű töltetek.

gyártó	kolonna/termék neve	névleges szemcseátmérő (μm)	réteg vastagság (μm)
Agilent	Poroshell 300	5,0	0,25
	Poroshell 120	2,7	0,50
Advanced Material Technology	Halo	2,7	0,50
	Halo Peptide-ES 160 Å	2,7	0,50
	Halo-5	5,0	0,60
Sigma-Aldrich	Ascentis Express	2,7	0,50
	Ascentis Express Peptide-ES 160 Å	2,7	0,50
	Ascentis Express F5	5,0	0,60
Phenomenex		5,0	
		2,6	0,35
	Kinetex	1,7	0,23
		1,3	
	Aeris Peptide	3,6	0,50
		1,7	0,23
Thermo Scientific	Aeris Widepore	3,6	0,20
	Accucore	2,6	0,50
Macherey-Nagel	Nucleoshell	2,7	0,50
	Brownlee SPP	2,7	0,50
Perkin Elmer	Brownlee SPP Peptide-ES	2,7	0,50
	Sunniest	SunShell	2,6
jelenleg nem kapható		1,7	0,35
	Eiroshell	1,7	0,25
		1,7	0,15

Horváth, Tanaka és az általuk kialakított műhelyek és azok munkatársai.²²⁻²⁵ Kereskedelmi forgalomban a Merck és a Phenomenex cég által forgalmazott termékek vannak (Chromolith, illetve Onyx). Az utóbbi a Merck liszenca alapján gyártja a kolonnát. Az első generációs szilikagél alapú monolit 2000-ben került kereskedelmi forgalomba. Tavaly jelent meg a továbbfejlesztett változat, ami a második generációs monolit nevet kapta. A töltetek elektronmikroszkópos felvételét a 7. ábrán mutatjuk be.²⁶

A 7. ábrán a sötét rész az átfolyó pórus a szilikagél váz (skeleton). A világos részek adják a szilikagél alapvázat, míg a sötét részek a nagy átmérőjű pórusokat. A szerkezet olyan szivacsoshoz hasonlít, ahol a pórusok nyitottak és egymással összeköttetésben vannak. A mozgófázis áramlása ezekben a μm-es nagyságrendű pórusokban történik. Ahogy a 7. ábrán is jól látható, a pórusok átmérője közel állandó.



7. Ábra. Első (balra) és második generációs (jobbra) szilikagél alapú monolitok elektronmikroszkópos képei.

Ebből következik, hogy áramlási ellenállás oldaláról nézve nincs szűk keresztmetszet, amelyet a szemcsés töltetknél a legkisebb átmérőjű csatorna ad meg. Töltetes kolonnánál az áramlási csatornák átmérőjét a szemcseátmérőből lehet becsülni. Szabályos alakú, gömbszimmetrikus töltetknél ez a szemcseátmérő 1/3 része. Tehát egy 3 μm-es töltetnél ez 1 μm-nek felel meg. Ez csak akkor igaz, ha a töltés során a részecskék nem sérülnek és a szemcseátmérő eloszlás szűk és az átlagos szemcseátmérőnél sokkal kisebb szemcséket töltés előtt eltávolították. A mozgófázis áramlása ezekben az egymással összeköttetésben lévő pórusokban történik, míg a visszatartást a vázban lévő mezopórusok adják. Az áramlást lehetővé tevő pórusok átmérője 1-3 μm, a visszatartást eredményező mezopórusok átlagos átmérője 10-20 nm, a kereskedelmi forgalomban lévőé 13 nm. Ennek a töltetnek a fajlagos felülete nagyobb, mint 100 m²/g, ami megfelel a szemcsés töltetknél mért értékeknek. Az ábrából az is látható, hogy a pórustérfogat (sötétebb rész) aránya nagy a váz (világosabb rész) arányához képest (kis fázisarány). A monolit kolonna porozitása, összevetve a szemcsés töltetű kolonnákkal, sokkal nagyobb. Ez megszabja a kolonna áramlási ellenállását (permeabilitását), ebből következik, hogy ugyanolyan térfogat-áramlási sebességhez sokkal kisebb nyomásesés tartozik. Ez igaz, mind a szilikagél alapú, mint a szerves polimer alapú monolitokra. Az első monolitok 10 cm hosszúak voltak, nagy áramlási sebesség mellett használták az elemzési idő csökkentés érdekében. Ezek nem feleltek meg a folyadékkromatográf-tömegspektrométer (LC-MS) csatolt technikának. Ez vezetett el az ultragyors monolit kialakításához. Először a kolonna hosszát csökkentették 5 majd 2,5 cm-re, majd a kolonna belsőátmérőjét 4,6 mm-ről 3, majd 2 mm-re. Az 5 cm hosszú 2 mm átmérőjű monolit kolonna (Chromolith FastGradient) jól alkalmazható LC-MS módszerekhez, illetve UHPLC készülékekben használva gyors és hatékony elválasztások megvalósítására.

Az egybefüggő, és közel azonos átmérőjű pórusok a kolonna permeabilitását nagyban növelik. Elméletileg levezetve ezt, visszajutunk a klasszikus Kármány-Kozeny összefüggéshez.

$$K = \frac{\varepsilon^3}{180(1-\varepsilon)} d_p^2 \quad (9)$$

ahol a K jelenti a kolonna permeabilitását, ε a porozitást és a d_p szemcsés töltetű kolonnánál a szemcseátmérőt, mint karakterisztikus paramétert (domain size), a monolit kolonnánál az áramlást biztosító pórusok átmérőjének és a szilárd fázis vastagságának az összege. A kolonna porozitását a hagyományos módon tudjuk értékelni,

nevezetesen a kolonnán belül található üres térfogat és a kolonna össz-térfogatának hányadosaként. A permeabilitás és a kolonnán létrejövő nyomásesés között a következő összefüggés teremt függvény kapcsolatát:

$$K = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{\Delta p} \quad (10)$$

ahol az η a mozgófázis viszkozitását jelenti. Átrendezve az egyenletet Δp -re a következő összefüggést kapjuk:

$$\Delta p = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{K} \quad (11)$$

Tehát a kolonna áramlási ellenállása (permeabilitása) közvetlenül megszabja a kolonnán a nyomásesést. Ez viszont a kolonna porozitásával függ össze. Szilikagél alapú monolit kolonnáknál a teljes porozitás $\varepsilon=81\%$.²⁶ Szemcsés kolonnáknál, amelyeket a hagyományos HPLC és UHPLC technikánál használunk ez az érték 50-70% ugyan, de az áramlási csatornákat adó szemcsék közötti porozitás kisebb, mint 40%, ehhez járul a nem egyenletes csatorna-átmérő, aminek következtében a K értéke tovább csökken. Az UHPLC technikában a mechanikai stabilitás növelése miatt a porozitás értéke $\varepsilon \sim 50\%$. Bevezethetjük a ϕ paramétert, amely az áramlási ellenállással arányos tényező:

$$\phi = \frac{d_p^2}{K} = \frac{d_{dom}^2}{K} \quad (12)$$

Az összefüggés egyértelmű függvénykapcsolatot ad a karakterisztikus méret (szemcseméret vagy domain méret $/d_{dom}/$) és az áramlási ellenállás valamint a karakterisztikus méret és a ϕ között. A monolit kolonnáknál, ahol az átfolyó pórus és a váz átmérő viszony közel állandó, a ϕ értéke is állandó, összevetve egy 5 μm átlagos szemcseátmérőjű kolonnával, közel egy nagyságrenddel kisebb. Az áramlási ellenállás tehát kevésbé szab határt az elemzések gyorsításának. Ha figyelembe vesszük egy kolonna által elért tányérszámot, retenciós időt és a létrejövő nyomásesést (azaz a permeabilitást) akkor a kolonna abszolút teljesítménye az elválasztási ellenállással (E) definiálható:

$$E = \frac{t_R \Delta p}{N^2 \eta (1+k)} \quad (13)$$

A monolit kolonnák elméletileg nagy lehetőséget adnak a gyors elválasztásokra, az elválasztási ellenállásuk igen kedvező, sok esetben jobb, mint a szemcsés tölteteké. Gyakorlatban azonban technikai problémák okozzák, hogy az elméletinél kisebb hatékonyságot lehet velük elérni. Ezt, a nemrég megjelent második generációs monolit töltetek részben kiküszöbölik, ahol az átfolyó pórusok egyenletességének növelésével nagyobb kinetikai hatékonyságot tudtak elérni. A második generációs monolit porozitása azonos az első generációval, viszont az átfolyó pórusok és a falvastagság valamivel kisebbek, mint az elődjénél voltak. Ennek következménye természetesen az áramlási ellenállás növekedése. Azonos dimenziójú második generációs kolonnán – azonos térfogat áram mellett – kb. kétszer nagyobb nyomás esik, mint egy első generációs monoliton. A szilikagél alapú monolit kolonnák műanyag

házban kerülnek forgalomba (poliéter-éter-keton), ez behatárolja az alkalmazható felső nyomást, ami 200 bar.

Meg kell említenünk néhány szóban a szerves polimer alapú (polimetakrilát, poliakrilamid, poli-sztirén-divinilbenzol) monolitokat is, amelyeket elsősorban makromolekulák (fehérjék, peptidok, oligonukleotidok) elválasztására sikeresen alkalmaznak.²⁷⁻³² Elsősorban jó pH és hőstabilitásuk, valamint a szilanol csoportok hiányából eredő - káros másodlagos kölcsönhatások, ioncserés hajlam hiánya miatti – kedvező tulajdonságok végett terjedtek el a fehérje analitikában. Kereskedelmi forgalomban a Thermo Scientific cég ProSwift név alatt megjelent kolonnái (RP-1S, RP-2H, RP-3U és RP-10R) kaphatók.

2.4. Szemcsés teljesen porózus, héjszerkezetű és monolit kolonnák összehasonlítása

A gyakorlatban általában arra vagyunk kíváncsiak, hogy melyik kolonna adja a leggyorsabb vagy a legnagyobb hatékonyságú elválasztást. Eddig szó esett a van Deemter típusú ($H-u$) görbéről, amelyek megmutatják, hogy adott kolonnával milyen elméleti tányérmagasság érhető el, egy adott lineáris sebesség (vagy mozgófázis térfogatáram) tartományban. Ezekkel a görbékkel összehasonlíthatjuk a különböző kolonnákat aszerint, hogy melyik kolonna ad jobb tányérszámot egy adott lineáris sebességnél. Viszont ezek a $H-u$ görbék nem adnak tájékoztatást arról, hogy egy adott elválasztás mennyi időt igényel, illetve hogy mi is az a maximális tányérszám vagy leggyorsabb elválasztás, ami megvalósítható az adott kolonnával. Hogy ilyen következtetéseket vonjunk le, figyelembe kell vennünk a kolonnák permeabilitását, illetve mechanikai stabilitását (nyomásállóságát) is. Másik nehézség a $H-u$ görbékkel a különböző morfológiájú töltetek összehasonlítása, hiszen a karakterisztikus tulajdonságok eltérőek egy monolitnál, egy teljesen porózus vagy egy héjszerkezetű szemcsés töltetnél.

A kinetikus görbék módszerével - a kísérletileg felvett $H-u$ adatokat felhasználva - egyszerűen elvégezhetjük az analízis idő és tányérszámok „extrapolálását” egy adott (pl. maximális) nyomásértékre. Így megtudhatjuk, hogy mi a maximális elérhető tányérszám adott analízis időn belül, illetve hogy mi a legrövidebb idő egy adott tányérszám megvalósítására. Ehhez kísérletileg meg kell határoznunk a kolonna permeabilitását (lásd 10. egyenlet).

Ezután, - a mozgófázis viszkozitásának ismeretében - egy adott nyomásesésre (ΔP_{max}) egyszerűen kiszámolhatjuk t_0 illetve N értékét (extrapolált) az alábbi összefüggéseket alkalmazva:

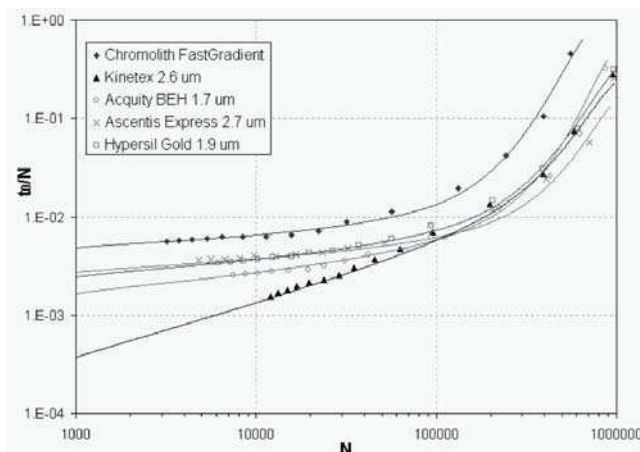
$$t_0 = \frac{\Delta P_{max}}{\eta} \left(\frac{K}{u^2} \right) \quad (14)$$

$$N = \frac{\Delta P_{max}}{\eta} \left(\frac{K}{u H} \right) \quad (15)$$

A kapott adatokat többféle képen is ábrázolhatjuk. Leggyakrabban a t_0 , t_0/N vagy t_0/N^2 értékeket szoktuk megjeleníteni a tányérszám függvényében. Mindhárom

érték arányos az analízis idővel. Továbbá, az adott tányérszámhoz tartozó kolonna hossz is meghatározható, hiszen kísérletileg megmértük a H értékeket és kiszámoltuk a maximális nyomáshoz tartozó tányérszámot. A kétfoldos szorzata megadja azt a kolonna hosszát, amivel az adott tányérszám elérhető. A kinetikus elmélet további részleteit nem tárgyaljuk, számos közleményben olvasható.³³ Ha a kinetikus görbék módszerével összehasonlítjuk a jelenlegi leghatékonyabb különböző morfológiájú tölteteket, érdekes következtetéseket vonhatunk le.

A következő példában 5 cm-es kolonnák kinetikai tulajdonságát hasonlítottuk össze, kis gyógyszer molekulák elválasztására (monolit, teljesen porózus 2 μm alatti, illetve héjszerkezetű 2,6 és 2,7 μm -es töltetek) (8. ábra).³⁴



8. ábra. Összehasonlító kinetikus görbék (monolit, 1,7 és 1,9 μm -es teljesen porózus és 2,6-2,7 μm -es héjszerkezetű töltetek).

Korábban részleteztük, hogy az adott töltet típusokkal milyen tányérszámok várhatók, illetve beszéltünk a kolonnák permeabilitásáról (áramlási ellenállásáról). Jelenleg a legjobb tányérszámok, a legnagyobb kinetikai hatékonyság, a 2 μm alatti teljesen porózus, illetve a 2,6-2,7 μm -es héjszerkezetű töltetekkel érhető el. E két töltettel nagyjából azonos tányérszámokat tudunk megvalósítani, viszont a 2,6-2,7 μm -es héjszerkezetű töltetekkel fele vagy harmad akkora nyomáson tudunk dolgozni, mint a 2 μm alatti töltetekkel. A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható monolitoknak rendkívül kedvező a permeabilitása, viszont az elérhető tányérszámok jóval elmaradnak az előző két szemcsés töltethez képest. Figyelembe kell vennünk a kolonnák mechanikai stabilitását is. A szilikagél alapú monolitoknak általában 200 bar, a 2,6-2,7 μm -es héjszerkezetű tölteteknek 600-1000 bar és a 2 μm alatti teljesen porózus tölteteknek 800-1200 bar a nyomásállósága. A 8. ábra ezeket a tulajdonságokat együttesen foglalja össze. Az időegységre jutó tányérszámot (t_g/N) ábrázoltuk az elválasztáshoz szükséges tányérszám függvényében. Az ábrán a kis t_g/N , illetve az alacsony N szakasz ($N < 20\text{--}30000$) felel meg a gyors elválasztásoknak (viszonylag kis tányérszám és rövid analízis idő). Ebben a tartományban (az ábra bal alsó negyede) azt látjuk, hogy adott tányérszám (pl. $N=20000$) leggyorsabban a 2,6 μm -es héjszerkezetű (Kinetex) töltettel valósítható meg. A gyakorlatban általában ez a tartomány ahol dolgozni szoktunk. Kicsit elmarad ettől a teljesen porózus 1,7 μm -es Acquity BEH, majd a 2,7 μm -es héjszerkezetű Ascentis Express, és a teljesen porózus

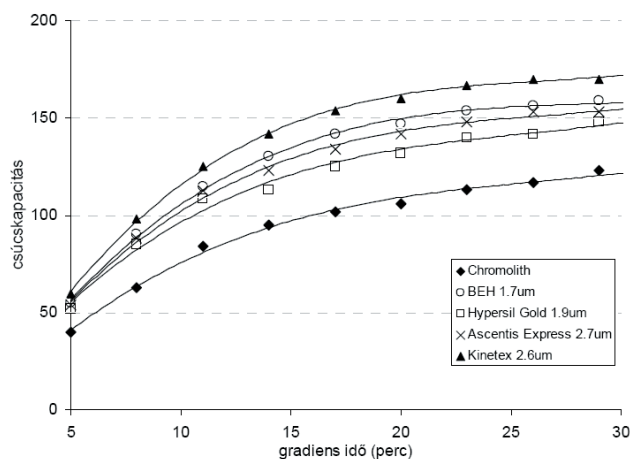
1,9 μm -es Hypersil Gold szinte azonosan teljesít. Végül a monolit kolonnával (Chromolith) kapjuk a leghosszabb idejű elválasztást. Kissé eltérő rangsort kapunk a nagyfelbontású elválasztások tartományában (az ábra jobb oldali fele). Például, ha az elválasztás tányérszám igénye 300000, akkor a két teljesen porózus 2 μm alatti és a két héjszerkezetű töltet nagyjából azonos analízis időt biztosít, viszont a monolit kolonnát használva lényegesen hosszabb időre van szükség a 300000-es tányérszám elérésére.

A példából jól látszik, hogy az elválasztás céljának megfelelően kell kolonnát választanunk. Nem mondhatjuk ki, hogy melyik kolonna a legjobb. A héjszerkezetű 2,6-2,7 μm -es töltetek általában jól teljesítenek, alkalmazhatóak gyors és nagyfelbontású elválasztásokra egyaránt.

A gyakorlatban a folyadékkromatográfiai elválasztások többségét gradiens elúciós módban végezzük. A gradiens elválasztás hatékonyságát általában a csúskapacitással jellemezzük. A csúskapacitás annak a mérőszáma, hogy adott idő alatt (pl. a gradiens program ideje) hány darab csúcsot tudunk egymástól elválasztani egy meghatározott csúcsfelbontással (általában $R_s=1$). Számos összefüggés található az irodalomban a csúskapacitás (n) leírására, a gyakorlatban általában a gradiens idő (t_g) és a csúcsszélesség (w) hányadosát vesszük alapul:

$$n = 1 + \frac{t_g}{w} \quad (16)$$

Természetesen a csúskapacitás sok változótól függ. Nagymértékben függ a gradiens időtől, a térfogatáramtól, a gradiens meredekségétől vagy a mozgófázis hőmérsékletétől. A következő példában szintén 5 cm-es kolonnák hatékonyságát hasonlítottuk össze azonos gradiens meredekség, gradiens idő, hőmérséklet és térfogatáram mellett (9. ábra).



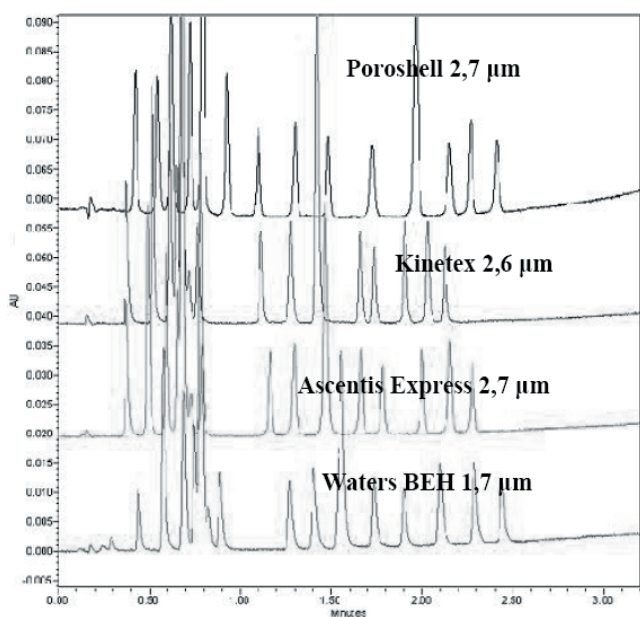
9. ábra. Összehasonlító csúskapacitás görbék (monolit, 1,7 és 1,9 μm -es teljesen porózus és 2,6-2,7 μm -es héjszerkezetű töltetek, 5 cm x 2,1 mm kolonnák), tesztkomponensek: szteroidok.

A 9. ábra szerint – az alkalmazott kísérleti körülmények között – a 2,6 μm -es héjszerkezetű Kinetex töltet adja a legnagyobb csúskapacitást. Fél órás gradiens programmal, az 5 cm-es kolonnával akár 170-180 csúcsot is elválaszthatunk egymástól. Kicsit elmarad a két teljesen porózus 2 μm alatti és 2,7 μm -es teljesen porózus töltet,

bár még ezekkel is igen nagy csúskapacitás érhető el. Az 5 cm-es monolit kolonnával maximum 110-120 közötti csúskapacitás érhető el, ami körülbelül azonos, mint egy 3-4 μm -es teljesen porózus töltet hatékonysága.

Hasonlóan az izokratikus elúciós módhoz, gradiens módban is számolhatunk elválasztási ellenállást vagy kinetikus görbéket és hasonló eredményt kapunk, mint izokratikus módban. Jelenleg a legígéretesebbnek a 2-3 μm közötti héjszerkezetű töltetek tűnnek, hiszen kiváló kinetikai hatékonyságuk viszonylag nagy kolonna permeabilitással társul. Nemrégiben kerültek forgalomba 2 μm alatti héjszerkezetű töltetek, amelyek rendkívül nagy kinetikai hatékonyságot mutatnak. Egy 5 cm-es, 1,7 μm -es héjszerkezetű töltettel akár $N=17000$ tényérszám is elérhető, ami korábban elképzelhetetlen volt.

A következő ábrán (10. ábra) gyors gradiens elválasztásokra mutatunk be példát. Korszerű 5 cm-es kolonnákkal 14 szteroidot választottunk el, mindössze 2,5 perc alatt.³⁵ A gyógyszeriparban különösen nagy jelentősége van az elválasztások gyorsításának, hiszen mind a módszerfejlesztési- mind pedig a rutin vizsgálatok ideje drasztikusan csökkenthető. Hagyományos készülékeken, 15-25 cm-es kolonnával (3-5 μm -es töltet) egy hasonló minőségű elválasztás körülbelül 8-15 percet igényelne. Korszerű 5 cm x 2,1 mm-es kolonnák alkalmazásával a módszerfejlesztési idő körülbelül harmadára-negyedére csökkenthető a hagyományos kolonnákhoz képest.



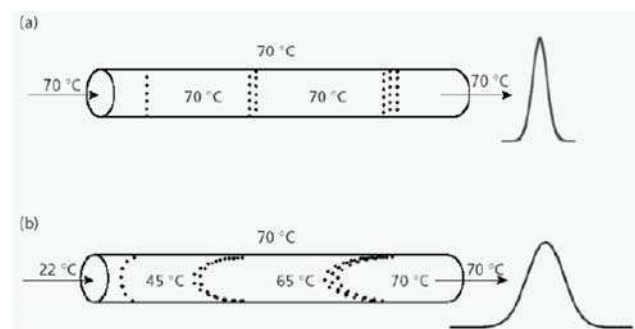
10. Ábra. Szteroidok elválasztása 5 cm x 2,1 mm kolonnákon (3 perc gradiens program, 0,8 mL/perc térfogatáram).³⁵ Kolonnák: Héjszerkezetű Kinetex 2,6 μm , Poroshell 2,7 μm , Ascentis Express 2,7 μm és teljesen porózus Waters BEH 1,7 μm .

2.5. Nagyhőmérsékletű elválasztások

Folyadékkromatográfias elválasztások sebessége gyorsítható a mozgófázis hőmérsékletének emelésével is. A hőmérséklet emelésével ugyanis csökken a mozgófázis viszkozitása és gyorsul az anyagátadás (nő a diffúziós állandó). A $H-u$ görbék optimuma a nagyobb lineáris sebességek irányába tolódik el és felszálló ágak (C tagra

jellemző tartomány) meredeksége csökken. Ez könnyen belátható a 6. egyenletből, hiszen a lineáris sebesség optimuma a diffúziós állandó négyzetgyökével arányos. A csökkent viszkozitás miatt a nyomásesés is kisebb lesz, tehát a lineáris sebességet tudjuk fokozni anélkül, hogy nagy nyomás teljesítményre volna szükség. Elméletileg tehát nagyon ígéretes a mozgófázis hőmérsékletének emelése. Természetesen a hőmérséklet előnyös hatását már nagyon korán felismerték és 1969-ben a technikát HTLC-nek (**H**igh **T**emperature **L**iquid **C**hromatography) nevezték el. Antia és Horváth különösen nagy előnyöket tapasztalt makromolekulák elválasztásakor.³⁶ Később, 1995-ben Chen és Horváth fehérjét választott el 120 °C-os mozgófázis hőmérséklet alkalmazva, az elválasztás mindössze 10 másodperces volt!³⁷ Akkoriban ez megdöbbentette a kromatográfias világot, senki nem gondolta, hogy fehérjét lehet ilyen magas hőmérsékleten vizsgálni. Azóta viszont a 70-90 °C-os mozgófázis hőmérséklet teljesen rutinszerű lett a fehérjék fordított fázisú elválasztásaiban. Makromolekulák anyagátadási tulajdonságai nagymértékben javíthatók a diffúziós tulajdonságok fokozásával. A molekulák diffúziós állandóját pedig elsősorban a hőmérséklet szabja meg.

A HTLC-s módszerek egyik kritikus eleme, a mozgófázis megfelelő előmelegítése (pre-heating). Ennek már 60 °C feletti is döntő jelentősége lehet.³⁸ Nagyhőmérsékletű folyadékkromatográfiában a csúcsalak nagymértékben függ az előfűtött mozgófázis tömegétől (pre-heater térfogattól) az adagolt térfogattól és a mintaoldat oldószerétől.³⁹ Azok a készülékek, amelyek csak az oszlopetert fűtik, általában nem használhatóak 60 °C feletti elválasztásokhoz. A 11. ábrán szemléltetjük a mozgófázis előfűtés szerepét. A kolonna után viszont a mozgófázis lehülésére van szükség, hogy a káros detektorzajokat csökkentsük.⁴⁰ A detektor cella termosztálása nélkülözhetetlen, illetve megfelelő hosszúságú összekötő vezetékre van szükség a kolonna kimenet és detektor cella között, hogy a lehülés megtörténhessen. Ez természetesen növeli a kolonnán kívüli térfogatokat.



11. Ábra. Csúcsszélesedés a nagyhőmérsékletű folyadékkromatográfiában mozgófázis előfűtést alkalmazva (a) és csak a kolonna teret fűtve (b).

A nagyhőmérsékletű elválasztások nem nagyon terjedtek el a gyakorlatban, persze van néhány speciális terület ahol jól alkalmazhatók. Ennek két fő oka van, 1) kevés hő-stabil állófázis kapható kereskedelmi forgalomban, illetve 2) a nem hő-stabil komponensek lehetséges kolonnán létrejövő termikus bomlása. Állófázis oldalról, elsősorban a cirkónium-oxid alapú töltetek ugyan ígéretesek,^{41,42} de a retenciós tulajdonságok lényegesen eltérnek a szilikagél alapú töltetekhez képest, ezért a gyógyszeripar még „nem fogadta el” ezt a típusú állófázist. Néhány szerves polimer és

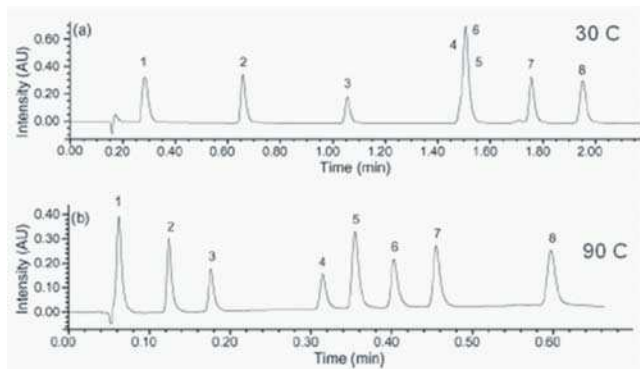
grafit alapú állófázis is igen jó hőstabilitási tulajdonságokat mutat, akár 150-200 °C-ig is alkalmazhatóak.⁴³

Jelenleg a hőmérséklet adta lehetőségeket elsősorban az elválasztás szelektivitásának módosítására/hangolására használjuk, nem pedig a módszerek gyorsítására. Ebből a célból a mozgófázis hőmérsékletét általában 30-60 °C között szoktuk változtatni. A komponens visszatartása a hőmérséklettel a következő általános összefüggéssel írható le (van't Hoff egyenlet):

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \beta \quad (17)$$

ahol ΔH a standard entalpia változás, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, ΔS a standard entrópia változás, β pedig a fázisarány. A hőmérséklet emelésével a visszatartás általában csökken. Ha konformációs változás következik be a hőmérséklet-változtatással – főleg peptidok vagy fehérjék vizsgálatakor – akkor bizonyos esetekben a visszatartás növekedhet, ahogy emeljük a mozgófázis hőmérsékletét (pl. Insulin).

A mérsékelt nagyhőmérsékletnek (60-90 °C) igen nagy jelentősége lehet az UHPLC és HTLC technikák kombinálásakor. A kis szemcsés töltetek alkalmazása megemelt hőmérsékleten nagyon ígéretes lehet, hiszen a viszkozitást csökkentjük, azaz nagyobb térfogatárammal is tudunk dolgozni. Szerencsés esetben a szelektivitás is kedvezően alakulhat a magasabb hőmérsékleten, ekkor jelentősen lefaraghatunk az elválasztás idejéből. Erre mutat egy példát a 12. ábra.⁴⁴



12. Ábra. kismolekulás gyógyszerhatóanyagok elválasztása 1.7 μm-es tölteten 30, illetve 90 °C-on.

3. Elvárások egy gyors kromatográfias mérésekre alkalmas készülékkel szemben

Az előző fejezetben az elméleti lehetőséget vizsgáltuk meg, hogy hogyan növelhető az elemzés gyorsasága. Ebben a részben azt vizsgáljuk, hogy műszer oldalról nézve milyen követelmények vannak a különböző lehetőségek megvalósítására. Ennek megítéléséhez abból kell kiindulnunk, hogy a kromatogramon mért zónaszélesedés az két fő részből tevődik össze, az egyik a kolonna megszába, a másik a kolonnán kívüli zónaszélesítő hatások. Ezért a kromatogramon mért zónaszélesedés (variancia) tehát a kolonnán és azon kívüli hatásokból tevődik össze:

$$\sigma_{\text{total}}^2 = \sigma_{\text{ec}}^2 + \sigma_{\text{col}}^2 \quad (18)$$

ahol a σ_{col}^2 és a σ_{ec}^2 jelentik a kolonnán és a kolonnán kívüli zónaszélesedést.

Az adagolóban és az összekötő vezetékben azért van zónaszélesedés, mert az áramlás lamináris és a sebességi profil parabolikus, továbbá az egyes rétegek közötti keveredés elhanyagolható. Így a molekulák, melyek a cső falához közelebb vannak körülbelül fele sebességgel haladnak, mint a középső rétegben lévők. Ez az áramlási csúcscsúszás. A detektorban ehhez járul az áramlási sebesség változása is, és ha az elektronika lassú, akkor pedig un. alul mintavételezett jelet kapunk és nem megfelelő számú pontból épül fel a kromatográfias csúcs. Megállapodás szerint az oszlopon kívüli zónaszélesedés összege nem lehet nagyobb, mint a kolonnán mért csúcscsúszás tizede.

$$\sigma_{\text{ec}}^2 \leq 0,1 \cdot \sigma_{\text{col}}^2 \quad (19)$$

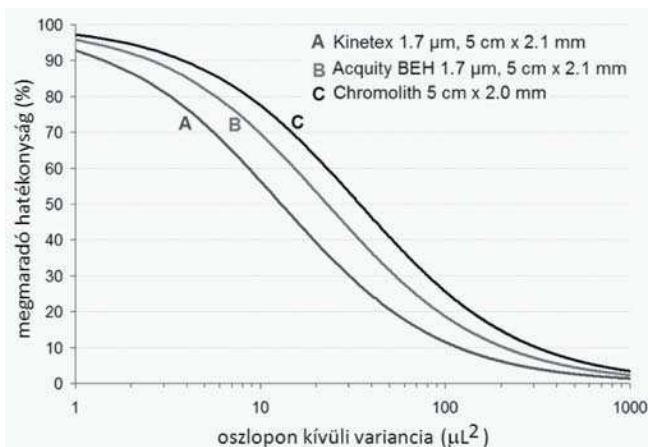
A csúcscsúszást (varianciát) térfogat-négyzet vagy idő-négyzet dimenziókkal tudjuk kifejezni. Minél kisebb a kolonna térfogata annál kisebb az eluálódó csúcs varianciája. Tehát minél kisebb a kolonna térfogat és minél jobb a kolonna hatékonysága, úgy válik egyre kritikusabbá az oszlopon kívüli csúcscsúszás hatása. Bevezethetjük a látszólagos tányérszám (N_{app}) fogalmát, ami felírható a kolonna által teljesített saját tányérszám (N_{col}) és az oszlopon létrejövő illetve azon kívüli varianciák viszonyával:

$$N_{\text{app}} = N_{\text{col}} \frac{1}{1 + \frac{\sigma_{\text{ec}}^2}{\sigma_{\text{col}}^2}} \quad (20)$$

Az un. megmaradó kolonna hatékonyság (E_r) egyszerűen felírható a következő módon:

$$E_r = 100 \cdot \frac{\sigma_{\text{col}}^2}{\sigma_{\text{total}}^2} \quad (21)$$

A következő példában 3 darab 5 cm-es kis átmérőjű (2 illetve 2,1 mm) korszerű kolonnák megmaradó hatékonyságát mutatjuk be az oszlopon kívüli variancia függvényében.⁴⁵ A 13. ábráról jól látszik, hogy ilyen kolonna dimenziókhöz, a készülék oldalról 1-2 μL² variancia engedhető meg. Hagyományos HPLC készülékek oszlopon kívüli csúcs varianciája általában $\sigma_{\text{ec}}^2 = 40-200 \mu\text{L}^2$ közé esik, míg az UHPLC készülékek általában $\sigma_{\text{ec}}^2 = 4-9 \mu\text{L}^2$ -tel járulnak hozzá a kromatográfias csúcs szélesedéséhez.⁴⁵ Azok a készülékek, amelyeket a gyártók mind a hagyományos HPLC-s, mind pedig az UHPLC-s elválasztásokhoz javasolnak (un. hibrid készülékek) általában $\sigma_{\text{ec}}^2 = 10-40 \mu\text{L}^2$ -tel járulnak hozzá a csúcs szélesedéséhez.⁴⁵ A tavaly megjelent legújabb fejlesztésű UHPLC készülék (Waters UPLC I-Class) oszlopon kívüli varianciája, a mérés körülményeitől függően $\sigma_{\text{ec}}^2 = 0,5-4 \mu\text{L}^2$ közé esik. Tehát a legkorszerűbb UHPLC készülékeket alkalmazva is jelentős hatékonyságot veszthetünk, nem tudjuk kihasználni a jelenlegi kolonna technológia valódi lehetőségeit. Jó kompromisszumnak tűnik a 3 mm-es átmérőjű kolonnák használata. Persze ekkor az analízis idő rovására tudjuk csak a hatékonyságot fokozni.



13. Ábra. Kis méretű korszerű kolonnák megmaradó hatékonysága az oszlopon kívüli zónaszélesedés (variancia) függvényében.

Összességében megállapíthatjuk, hogy jelenleg a kolonnatechnológia elhaladt a készülék fejlesztések mellett, és elsősorban új, még kisebb oszlopon kívüli térfogatokkal rendelkező készülékek fejlesztése a cél annak érdekében, hogy a meglévő kolonnákat megfelelően tudjuk üzemeltetni.

4. Összefoglalás

A cikk a jelenlegi leghatékonyabb kolonnák lehetőségeit és a gyors folyadékkromatográfia fejlesztési irányait foglalja össze. A kolonna térfogat csökkentése, a mozgófázis sebességének növelése és a kinetikai hatékonyság fokozása számos lehetőséget kínál az elválasztások gyorsítására. Emellett a kolonna permeabilitás növelése és a készülékek nyomás teljesítményének további fokozása mind hozzájárulhatnak az elemzési idők jelentős csökkentéséhez. A jelenkori kolonna-technológia forradalmában négy technika vetélkedik folyamatosan egymással. Nevezetesen az 1) egyre kisebb szemcsésű teljesen porózus töltetek, 2) héjszerkezetű töltetek, 3) monolit kolonnák és a 4) nagyhőmérsékletű elválasztások. Legsikeresebbnek az 1,7-2 μm-es teljesen porózus és a 2,6-2,7 μm-es héjszerkezetű töltetek bizonyulnak. Az 5 cm hosszú, 2,1 mm belső átmérőjű kolonnákkal az elemzési idő ma 1-5 perc közé esik, miközben akár 17000 tényezőszám is elérhető.

Ma, az UHPLC készülékek segítségével akár 1000-1300 bar nyomáson is dolgozhatunk. Azonban, ezeknek a rendkívül hatékony kolonnáknak a valódi teljesítménye (felbontó ereje) mégsem használható ki, mert a készülékek oszlopon kívüli térfogatai nagyban lerontják a kolonna látszólagos hatékonyságát. Jelenleg a kolonnatechnológia elhaladt a készülék fejlesztések mellett, és elsősorban új, még kisebb oszlopon kívüli térfogatokkal rendelkező készülékek fejlesztése a cél annak érdekében, hogy a meglévő kolonnákat megfelelően tudjuk üzemeltetni.

Hivatkozások

- van Deemter, J.J.; Zuiderweg, F.J.; Klinkenberg, A. *Chem. Eng. Sci.* **1956**, *5*, 271-289.
- Neue, U.D. *HPLC Columns*, Wiley-VCH: New York, **1997**.
- Neue, U.D.; Kele, M. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1149*, 236-244.
- Swartz, M.E.; Murphy, B. *American Laboratory* **2005**, *37*, 22-35.
- Swartz, M.E. *J. Liquid Chrom.* **2005**, *28*, 1253-1263.
- Fekete, Sz.; Fekete, J.; Ganzler, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 64-71.
- Gritti, F.; Farkas, T.; Heng, J.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 8209-8221.
- Wang, J.; Li, H.; Jin, C.; Qu, Y.; Xiao, X. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, *47*, 765-770.
- Fekete, Sz.; Oláh, E.; Fekete, J. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1228*, 57-71.
- Fekete, Sz.; Ganzler, K.; Fekete, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 56-64.
- Horváth, Cs.; Preiss, B.A.; Lipsky, S.R. *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 1422-1428.
- Horváth, Cs.; Lipsky, S.R. *J. Chromatogr. Sci.* **1969**, *7*, 109-116.
- Kirkland, J.J. *Anal. Chem.* **1969**, *41*, 218-220.
- Gritti, F.; Cavazzini, A.; Marchetti, N.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1157*, 289-303.
- Kaczmarek, K.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4648.
- Gritti, F.; Guiochon, G. *AIChE J.*, AICHE-09-11893.
- Gritti, F.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2012**, 121852, 31-44.
- Cabooter, D.; Fanigliulo, A.; Bellazzi, G.; Allieri, B.; Rottigni, A.; Desmet, G. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7074.
- Ruta, J.; Zurlino, D.; Grivel, C.; Heinisch, S.; Veuthey, J.L.; Guillaume, D. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1228*, 221-231.
- Fekete, Sz.; Berky, R.; Fekete, J.; Veuthey, J.L.; Guillaume, D. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1236*, 177-188.
- Fekete, Sz.; Berky, R.; Fekete, J.; Veuthey, J.L.; Guillaume, D. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1252*, 90-103.
- Hjertén, S.; Liao, J.L.; Zhang, R. *J. Chromatogr.* **1989**, *473*, 273.
- Svec, F.; Frechet, J.M. *J. Anal. Chem.* **1992**, *64*, 820.
- Gusev, I.; Huang, X.; Horvath, C. *J. Chromatogr. A* **1999**, *885*, 273.
- Minakuchi, H.; Nagayama, H.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **1998**, *797*, 121.
- Hormann, K.; Müllner, T.; Bruns, S.; Hölzel, A.; Tallarek, U. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1222*, 46-58.
- Greider, A.; Trojer, L.; Huck, C.W.; Bonn, G.K. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7747-7754.
- Levkin, P.A.; Eeltink, S.; Stratton, T.R.; Brennen, R.; Robotti, K.; Yin, H.; Killeen, K.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1200*, 55-61.
- Li, Y.Y.; Tolley, H.D.; Lee, M.L. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9416-9424.
- Sneekes, E.J.; Hun, J.; Elliot, M.; Ausio, J.; Borchers, C. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 2691-2698.
- Holz, G.; Oberacher, H.; Pitsch, S.; Stutz, A.; Huber, C.G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 673-680.
- Oberacher, H.; Parson, W.; Oefner, P.J.; Mayr, B.M.; Huber, C.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 510-522.
- Desmet, G.; Clicq, D.; Gzil, P. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4058-4070.
- Oláh, E.; Fekete, Sz.; Fekete, J.; Ganzler, K. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3642-3653.
- Fekete, Sz.; Fekete, J. *Talanta* **2011**, *84*, 416-423.
- Antia, F.D.; Horvath, Cs. *J. Chromatogr.* **1988**, *435*, 1.
- Chen, H.; Horváth, Cs. *J. Chromatogr.* **1995**, *705*, 3.
- Greibrokk, T.; Andersen, T. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 743.
- Fields, S.M.; Ye, C.Q.; Zhang, D.D.; Branch, B.R.; Zhang, X.J.; Okafe, N. *J. Chromatogr. A* **2001**, *913*, 197.
- Heinisch, S.; Rocca, J.L. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 642.
- Nawrocki, J.; Dunlap, C.; McCornich, A.; Carr, P.W.; Pert, I. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 1.

42. Nawrocki, J.; Dunlap, C.; Li, J.; Zhao, J.; McNeff, C.V.; McCormick, A.; Carr, P.W.; Part, I.I. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 31.
43. Neff, C.Mc.; Zigan, L.; Johnson, K.; Carr, P.W.; Wang, A.; Weber-Main, A.M. *LC GC* **2000**, *18*, 514.
44. Nguyen, D. T.T.; Guillarme, D.; Heinisch, S.; Barrioulet, M.P.; Rocca, J.L.; Rudaz, S.; Veuthey, J.L. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1167*, 76–84.
45. Fekete, Sz.; Fekete, J. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5286-5291.

Summary

This paper presents the possibilities of recent very efficient columns in fast liquid chromatographic separations. Decreasing the column dimensions, increasing the mobile phase velocity and the kinetic efficiency are the obvious ways of speeding up the separations. However, improving the column permeability and the pressure capability of liquid chromatographic instrumentations, are also of interest. The current rivalling approaches are the use of 1) very fine porous particles, 2) superficially porous particles, 3) monolithic columns and 4) elevated temperature. Among the fast liquid chromatographic techniques, sub-2 μm and core-shell

particles are the most popular and widespread ones today. Using 5 cm long, narrow bore very efficient columns enables to cut the analysis time into 1-5 minute interval.

The introduction of current UHPLC instrumentations now allows working at 1000-1300 bar. Extra-column band spreading also affects the measured performance (apparent plate number) of very efficient columns, especially for short columns with an internal diameter smaller than the classical standard of 4.6 mm. Today it is not possible to utilize the potential of these very efficient small columns.

Közeli infravörös spektroszkópia/mikroszkópia: roncsolásmentes kutakodás

GERGELY Szilveszter,¹ PÁRTA László,^{1,2} és SALGÓ András^{1,*}

¹ Budapesti Műszaki Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

² Richter Gedeon Nyrt., Biotechnológia Osztály

Több mint kétszáz esztendeje annak, hogy Sir William Herschel kísérleteivel (1800. február 11.) kimutatta a közeli infravörös (NIR, near-infrared) – vörös szín alatti– frekvenciatartomány jelenlétét, és rámutatott ennek fontosságára.^{1,2} A 780-2500 nm (vagy 12800-4000 cm⁻¹) hullámhossz- (ill. hullámszám-) tartományban a kémiai kötések első, második, harmadik rezgési felharmónikusainak és kombinációinak gerjesztése révén komplex rezgési állapotváltozások érhetők el, amely változások hullámhossz függvénye a spektrum. A spektrumok a molekuláris állapotváltozások összességéként, mint kémiai és fizikai „ujjlenyomatok” értelmezhetőek. Az ilyen „ujjlenyomatok” valamely jelenség, rendszer jellemzőit, összefüggéseit kifejező, ábrázoló, jelképező logikai vagy matematikai formulák lehetnek, melyek komplexitásukból eredendően különféle (pl. kémiai, fizikai, fiziko-kémiai, biológiai, biokémiai stb.) információkat tartalmazhatnak, hordozhatnak.

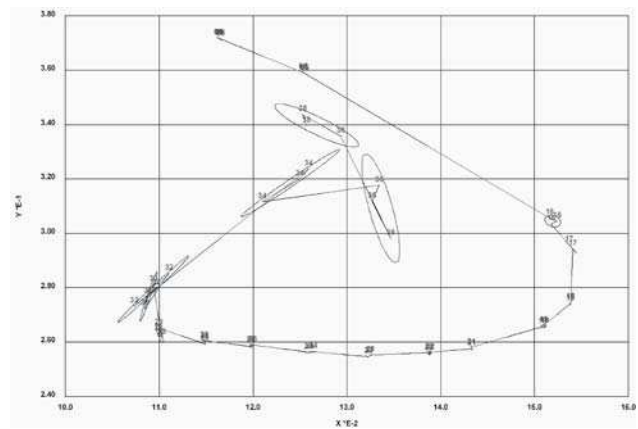
A spektrumok valós információtartalmát azonban nem mindig egyszerű felismerni, a bennük rejlő hordozott információkat gyakran különféle transzformációs módszerek, „lényegkiemelő” módszerek alkalmazásával lehet hatékonyan kinyerni. A transzformációs módszerek széles tárházából érdemes kiemelni, a spektrumok deriválásával (első és második deriváltak), az optikai szóródás korrekciójával (többszörös szóródási korrekció), valamint az adatredukciós módszerekkel (euklideszi távolság, Mahalonobis-távolság, polár távolság számítások) végzett eljárásokat, amelyek segítségével olyan transzformált spektrumokat vagy adatsorokat nyerhetünk, amik nagyságrendekkel több információt hordozhatnak, mint maga a primer spektrumserleg.³⁻⁹ A spektrumok információtartalma kiemelésének egy további hatékony útja a főkomponens analízis (PCA; principal component analysis), ami a spektrumok matematikai változékonyságának elemzésével, a lényeges (nagy változékonyságú) és lényegtelen (változékonyságot nem hordozó, kollineáris) részletek megkülönböztetésére nyújt lehetőséget.¹⁰

A biotechnológiai és gyógyszeripari gyakorlatban azért van szükségünk ezen matematikai, kemometriai módszerek egyre kifinomultabb használatára, mert nagyon gyakran egyedül csak a spektrum áll rendelkezésünkre – minden további kémiai, fizikai vagy bármely más, ún. referencia adat nélkül –, mint információforrás a vizsgált objektumokról. A biotechnológiai alapú gyógyszer- vagy hatóanyag-előállítási folyamatok különösen igénylik ezen spektrumalapú vizsgálati megközelítést, hiszen a klasszikus gyógyszer-előállításhoz képest itt a vizsgálandó anyagok, molekulák méretükben nagyobbak, komplexebbek, molekuláris környezetük (kísérő anyagok, metabolitok, fragmentumaik)

sokkal heterogénebb, a klasszikus analitikai vizsgálati módszerek nehezen vagy egyáltalán nem használhatók. Ezen vizsgálati megközelítés alkalmazása korábban jól bevált különféle természetes biológiai rendszerekben zajló folyamatok részleteinek elemzésére.¹¹

A biotechnológia alapú gyógyszer-előállítás általunk vizsgált két organizmusa az *Escherichia coli* és egy emlősejtes (CHO; Chinese hamster ovary) tenyészet, melyek fermentációs folyamatokban kerültek alkalmazásra. A fermentációs folyamatok közben tartására különféle PAT (process analytical technology) eszközöket használhatunk:

- hagyományos in-line érzékelőket (pl. pH, pO₂, pCO₂, T szondák);
- real-time eszközöket (pl. in-line NIR, ABER, on-line HPLC);
- korszerű és gyors at-line mérőeszközöket;
- adatgyűjtő (SCADA) rendszereket;
- kemometriai szoftvereket.



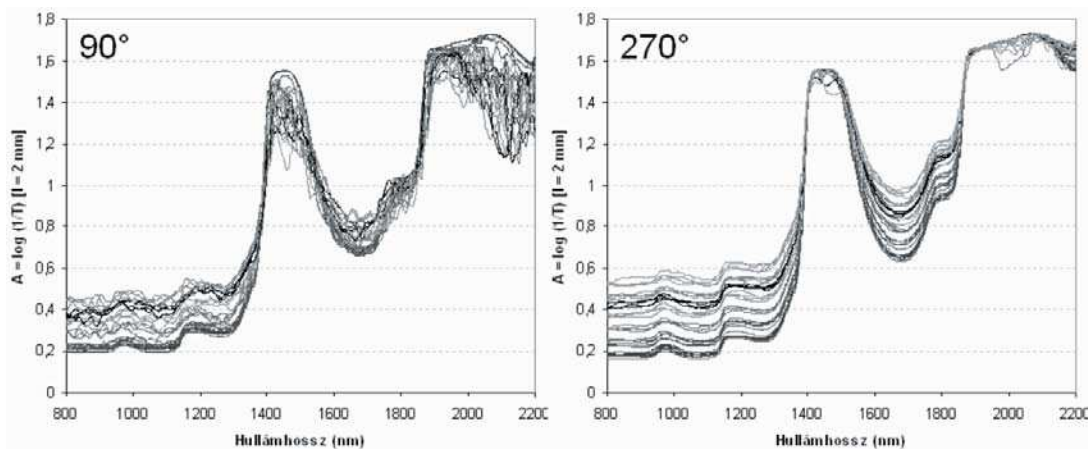
1. Ábra. NIR spektrumokból számított PLS minőségpontok változása az *E. coli* fermentáció lefutása során (0-38 óra).

Az 1. ábrán egy *E. coli* fermentáció off-line nyomon követésének eredményei láthatóak, ahol a spektrumok feldolgozását az ún. polár minősítő rendszerrel (PQS; polar qualification system), egy adatredukciós eljárással végeztük el. A fermentáció folyamatát (0-38 óra) a spektrumok alapján számított ún. „minőségpontok” időbeli változásával követjük. A minőségpontok időbeli rajzolata (trajektóriája) jellemző a biotechnológiai folyamatra, és az egyes minőségpontokhoz tartozó megengedhető szórás megadva, a fermentációs folyamat a spektrumok mérése és elemzése révén szabályozható, a technológiai célértékek jól közelíthetőek. Az eljárás különös előnye a gyors spektroszkópiai mérés (tipikusan fél perc) és az azonnali beavatkozás lehetősége.

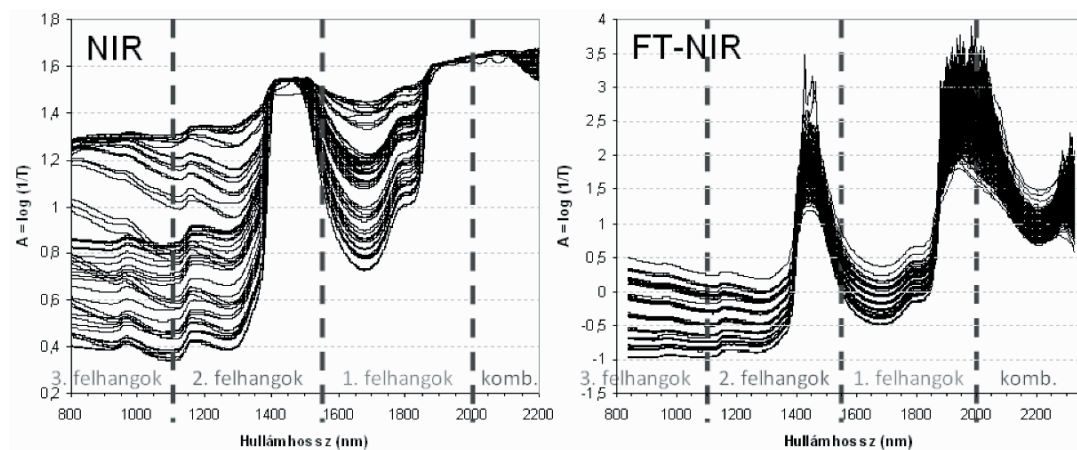
* email: salgó@mail.bme.hu

Egyszerűen fogalmazva azt mondhatjuk, hogy pontosan nem ismerjük a rendszerben lezajló biokémiai-molekuláris

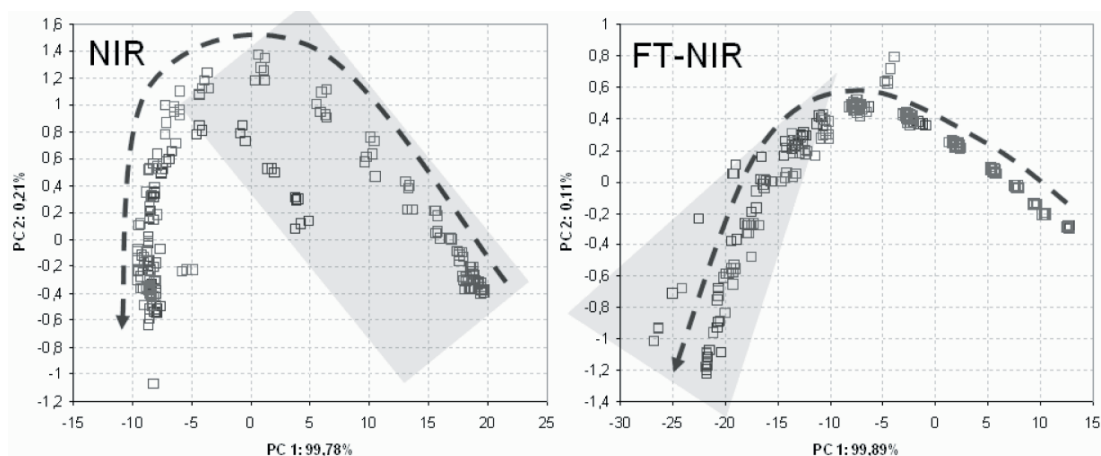
folyamatok és a molekuláris környezet változásának pontos részleteit, de a mért spektrum segítségével a fermentációs folyamatot ellenőrzött értékek között tudjuk tartani.



2. **Ábra.** Glicerín-víz modell rendszer NIR spektrumainak változása 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 és 2000 rpm kevertetés hatására a szonda 90°-os (balra) és 270°-os (jobbra) beállításai mellett.



3. **Ábra.** *E. coli* fermentációk NIR (balra) és FT-NIR (jobbra) spektrumainak változása a művelet során.



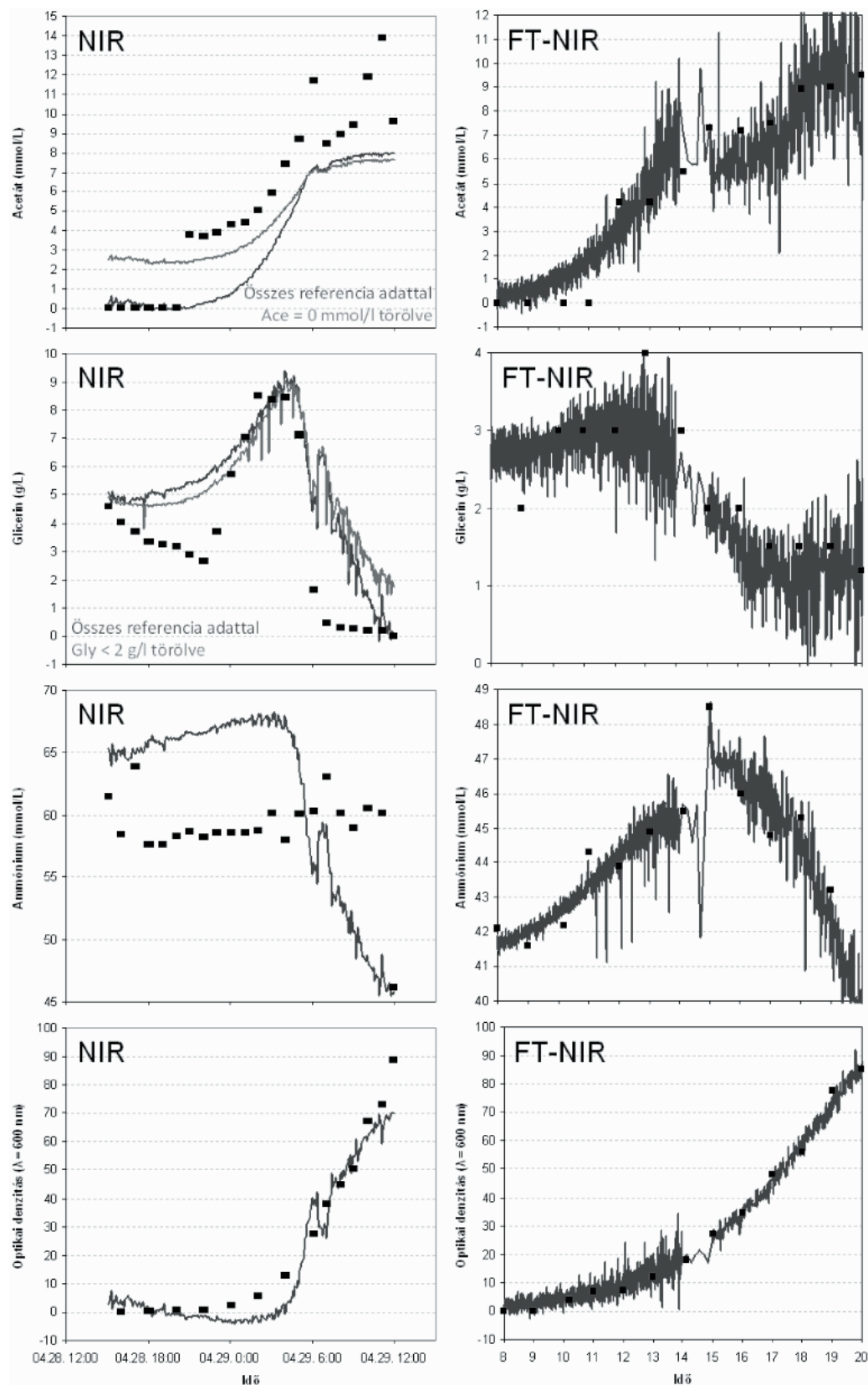
4. **Ábra.** A 3. felhangok (800-1100 nm) PCA szóródási ábrái az F1-F4 fermentációk NIR (balra), valamint az F5- F8 fermentációk FT-NIR (jobbra) technikával felvett spektrumai alapján.

A NIR spektrumok a kémiai, molekuláris információk mellett fizikai tulajdonságokat is hordozhatnak, tükrözhetnek. Ilyenek lehetnek az anyagok szemcsemérete, felületi tulajdonsága, homogenitása stb.

A2. ábrán egy glicerín-víz modell rendszer látható száloptikás módszerrel követve: a szonda elhelyezés (90°, 270°) és kevertetési sebesség (400-2000 fordulat/perc) hatásait mutatjuk be. A fermentációs műveletek során képződő

buborékok (képződés helye, nagysága, leszakadásuk) jelentősen befolyásolják a spektrum pontosságát, jel/zaj viszonyait. A bemutatott eredmény szerint, bármely

fordulatszám alkalmazása mellett a 270°-os szonda elhelyezés megfelelőbb, itt észlelhető a legalacsonyabb, keverés okozta „spektrumzaj”, vagyis a mérési feltételek optimalizálásában is segítségünkre van.



5. Ábra. *E. coli* fermentációk esetén az acetát, a glicerín, az ammónium koncentráció és az optikai denzitás időbeli változásának monitorozása NIR (balra) és FT-NIR (jobbra) technikával (—) és referencia adatokkal (■).

Négy-négy párhuzamos *E. coli* fermentációt végezve a folyamatok időbeli lefutását vizsgáltuk száloptikával ellátott diszperziós és Fourier-transzformációs (FT) NIR spektrométerek alkalmazásával, mely eredményeit a 3. ábrán mutatjuk be. Mindkét technika alkalmazása jól szemlélteti a fermentációs sarzsok óriási változékonyságát a művelet során. Ezen spektrumok PCA feldolgozásával a főkomponensek időbeli változását szemléltetjük a 4. ábrán. A párhuzamos fermentációk esetén (F1-F4 és F5-F8) kialakult trajektóriák hasonlósága jól megfigyelhető.

Ezen eredmények alapján érzékelhető, hogy a kizárólag spektrumváltozásokat elemző módszerrel képesek vagyunk a fermentációs folyamatot monitorozni, és szükség esetén a folyamatba beavatkozni.¹²

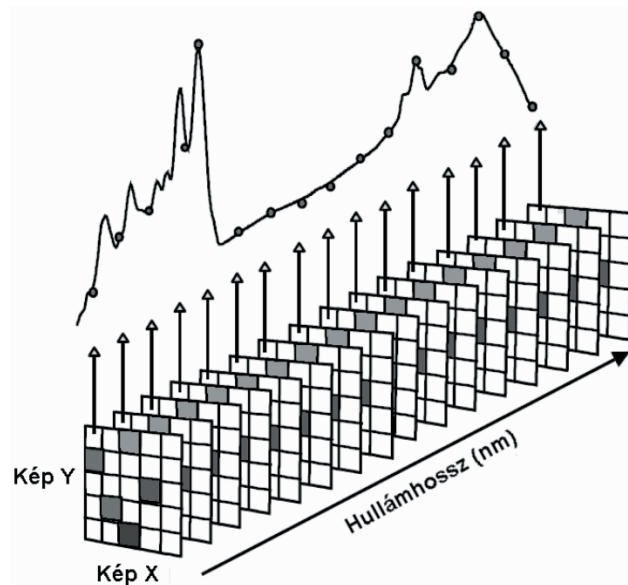
A fermentációk során párhuzamosan gyűjtött referencia adatok (mért kémiai, fizikai, fiziko-kémiai stb. paraméterek) felhasználásával, vagyis az optikai (spektrum) és referencia adatok összefüggéseinek meghatározása révén (a kalibráció és validálás lépéseit alkalmazva), olyan kvantitatív mérési módszerek alakíthatók ki, amelyek egyetlen spektrum felhasználásával az összes kalibrált paraméter meghatározására alkalmas lehet. Az 5. ábra *E. coli* fermentáció során detektálható acetát, glicerin, ammónium koncentráció és optikai denzitás paraméterek változásait mutatja a fermentáció során, diszperziós NIR és FT-NIR módszerek alkalmazása mellett. A spektrumok alapján prediktált, kvázi folyamatos koncentráció értékek mellett a pontszerűen ábrázolt referencia mérések adatai és tendenciái azt jelzik, hogy a NIR és FT-NIR módszerek egyaránt alkalmasak a fermentációs folyamatok kvantitatív monitorozására.¹³

Az infravörös spektroszkópia, annak különböző frekvencia tartományai (közele, ill. közép – analitikai – infravörös) egyaránt alkalmasak anyagazonosítási célokra. Ilyen célú használat esetén a spektrumkönyvtárak felépítését követő validálását követően nyílik lehetőség a csak spektroszkópiái információ alapján való azonosításra.¹⁴ A spektrumkönyvtárak használata során kétféle választ kaphatunk a vizsgált anyagra vonatkozóan:

- mi minőségileg a vizsgált anyag – vagyis azonosítjuk a spektrum hasonlóság alapján;
- mennyire hasonlít a könyvtárunkban hasonló, azonosított (standard) anyagokhoz – vagyis minőségileg mennyire tér el azoktól.

Az általunk felépített, gyógyszeripari célokat szolgáló könyvtár 65 különféle anyag összesen 390 tételét tartalmazza. A könyvtár dinamikus bővítésével (majd újra validálásával) fontos analitikai igény elégíthető ki és nagyszámú „nedves kémiai” analízis takarítható meg.

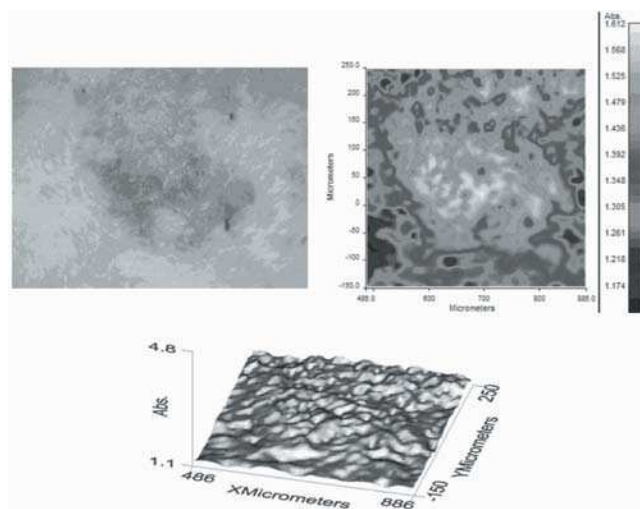
A gyógyszeripari és egyéb (biológiai, fiziológiai, orvosi stb.) területeken széleskörűen terjednek a közeli infravörös spektroszkópiái alapú képalkotó eljárások. A NIR alapú képalkotás során egy szokásos kétdimenziós mikroszkópos elemi képmezőben (képpontban), harmadik dimenzióképpen NIR spektrum kerül felvételre, amint azt a 6. ábra mutatja.¹⁵ Az általunk használt PerkinElmer Spotlight 400 FT-NIR mikroszkóp esetén a jellemző elemi képmező (pixel) méret $6,25 \mu\text{m} \times 6,25 \mu\text{m}$. Amennyiben egy $625 \mu\text{m} \times 625 \mu\text{m}$



6. Ábra. A „spektrális hiperkocka”.

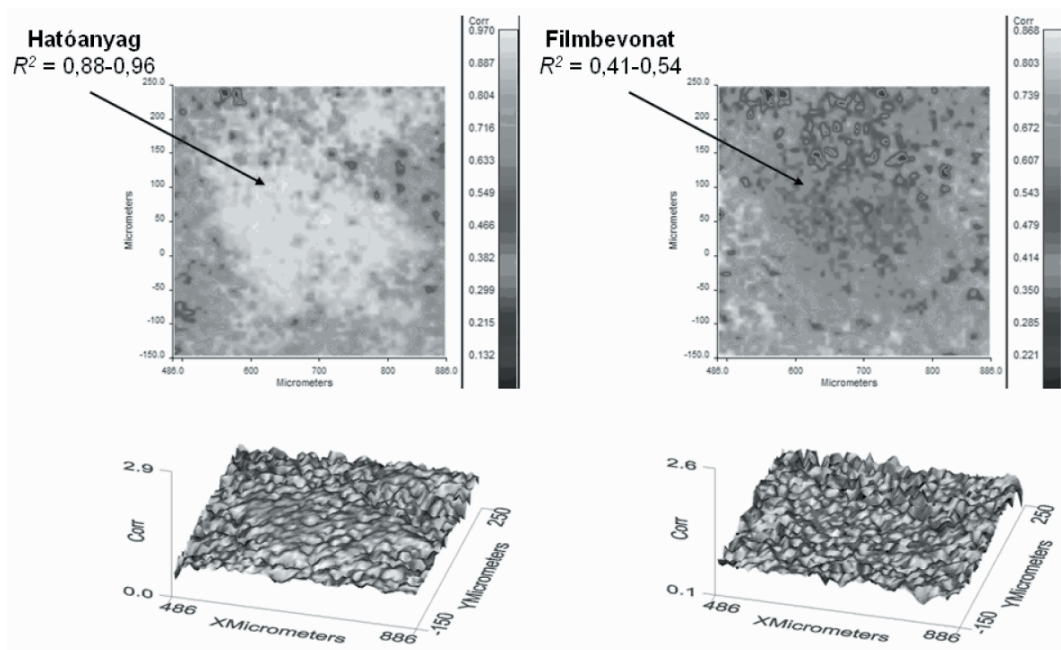
méretű képmezőt elemzünk, ez $100 \times 100 = 10\,000$ képpontot jelent, amelybe rendszerint 128 párhuzamos spektrum átlagolásával veszünk fel spektrumokat, ami végeredményben óriási mennyiségű adat feldolgozást igényli. A méréssel kialakuló, jellemzően háromdimenziós, hamis színezésű képek kiválóan alkalmasak a vizsgált objektumban található anyagok eloszlásának, homogenitásának vizsgálatára.

A következőkben két jellemző alkalmazási példán át mutatjuk be a képalkotó eljárás eredményét és előnyeit.

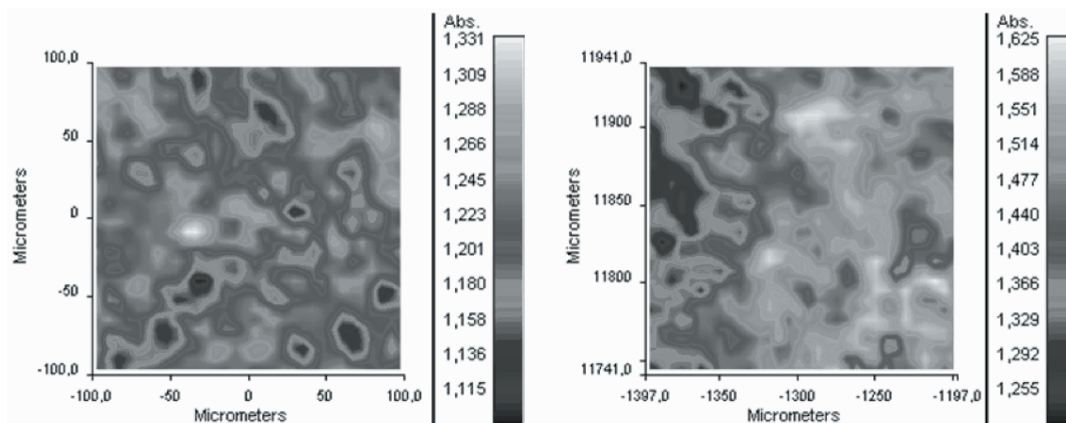


7. Ábra. A tabletta vizsgált területének mikroszkópos, szűrkeskálázott képe (középen a hibát okozó folttal), valamint 2D és 3D ábrázolása az átlagos abszorbanca értékek alapján.

Egy technológiai probléma során a tabletták felszínén elszíneződő foltosságot tapasztaltak, aminek okát kerestük. A 7. ábrán látható $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$ méretű képmezőről $6,25 \mu\text{m} \times 6,25 \mu\text{m}$ -es képpont mérettel $64 \times 64 = 4096$ képpontban, képpontonként 128 spektrumot átlagolva NIR képeket készítettünk hamis színezéssel. Mindkét képtípuson jól látható a folt és környezetének kémiai minőség szempontjából való különbsége. Két, ill. háromdimenziós



8. Ábra. A tabletta vizsgált területének 2D és 3D ábrázolása a hatóanyag (balra) és a filmbevonat (jobbra) spektrumaival kapott korrelációk során számított R^2 értékek alapján.



9. Ábra. A valódi (balra) és a hamisított (jobbra) tabletták vizsgált területének 2D ábrázolása az átlagos abszorbancia értékek alapján.

korrelációs térképeket készítettünk egyrészt a tabletták hatóanyagára, másrészt a bevonó anyag spektrumainak felhasználásával. Az eredményeket a 8. ábra mutatja be. A hatóanyaggal kapott korrelációs együttható $R^2 = 0,88-0,96$ között változott, ugyanezen érték a bevonó anyag esetén $R^2 = 0,41-0,54$ volt. Az eredmények tehát egyértelműen mutatják, hogy a „folt” a bevonó anyag hiányára utal, ami támpontot nyújthat a technológusok számára a bevonási művelet módosítását illetően.

A képkalkulációs eljárások megkönnyíthetik a tablettahamisítások kimutatását is. A valódi és hamisított tabletták gyakran vizuálisan nem vagy alig különböztethetők meg, esetleg a durvább szemcsészettség vagy felületi tulajdonságok utalnak a hamisításra. A NIR képkalkulációs eljárással azonban a kémiai és fizikai változékonyságba képesek vagyunk közvetlenül „betekinteni”. A 9. ábrán egy eredeti és egy hamisított tabletták képrészletét mutatjuk be. Míg az eredeti készítményben kisebb, elkülönülő csoportokban egyenletesen oszlanak el a különféle anyagok (hatóanyag, töltőanyag, hordozó), a hamisított készítményben az anyagok durva, egyenetlen eloszlását, erős

inhomogenitást tudunk kimutatni. A kimutatott különbségek a spektrumok abszorbancia értékei alapján is egyértelműek, ennél finomabb különbségtételt tesz lehetővé, ha a képeket a spektrumok főkomponens analízise után ábrázoljuk.

A fenti példák és alkalmazások azt jelentik, hogy a spektrum tulajdonságok és más kémiai, ill. fizikai módszerekkel mért anyagtulajdonságok között ok-okozati összefüggések vannak, vagy lehetnek. Ezen összefüggések feltárásában a különféle adatelemző, kemometriai módszerek alkalmazása révén eddig nem ismert, új felismerések tehetők.

Összefoglalóan elmondható tehát, hogy a különféle közeli infravörös spektroszkópiai módszerek (NIR, FT-NIR, NIR imaging) alkalmasak a klasszikus és biotechnológiai alapú gyógyszer-előállítás során:

- roncsolásmentes módon fermentáció, anyagazonosítás, homogenitás és bevonat vizsgálat, hamisítás, visszafelé ellenőrzés, csomagolóanyagok vizsgálatára;
- gyors, perces nagyságrendben képezhető jelsorozatok készítésére;

- rejtett, eddig fel nem ismert információk kiaknázására (adatbányászat, technológiai oknyomozások);
- gyors visszacsatolásra a technológiába, minőség-ellenőrzésbe, minőségbiztosításba.

A fenti tulajdonságok okán a közeli infravörös spektroszkópiai/mikroszkópiai módszereket az FDA mint „alternatív” módszereket elfogadja. A fenti technikák elsősorban adatfeldolgozási, kemometriai szempontból erősen tudás-intenzív módszerek. A felhasználók szempontjából a gyorsaságon túl talán legnagyobb előnye a módszereknek a rendkívül jó költséghatékonyság és nagy „áteresztőképesség”.

Összefoglalás

A közeli infravörös (NIR) spektrumok a molekuláris állapotváltozások összességéként, mint kémiai és fizikai „ujjlenyomatok” értelmezhetőek. A spektrumok valós információtartalmát azonban nem mindig egyszerű felismerni, a bennük rejlő hordozott információkat gyakran különféle transzformációs és kemometriai módszerek alkalmazásával lehet hatékonyan kinyerni.

A biotechnológiai és gyógyszeripari gyakorlatban azért van szükségünk ezen matematikai, kemometriai módszerek egyre kifinomultabb használatára, mert nagyon gyakran egyedül csak a spektrum áll rendelkezésünkre információforrás a vizsgált objektumokról. Vizsgálataink során bakteriális fermentációs folyamatok minőségi változásait követtük, monitoroztuk hatékonyan on-line NIR mérőszondás módszerrel. NIR és FT-NIR alapú mérőmódszerek alkalmazásával a fermentációs folyamatok során elfogyó, átalakuló és képződő anyagok (szubsztátum, intermedier, metabolit, sejttömeg) kvantitatív meghatározásra alkalmas kalibrációkat fejlesztettünk és validáltunk.

NIR mikroszkópiai képalkotó eljárásokat alkalmaztunk tabletta termékek homogenitásának vizsgálatára, ellenőrzésére és bemutattuk ezen vizsgálati technika alkalmazhatóságát a hamisítások kimutatásában.

Abstract

Near infrared (NIR) spectra are complex manifestation of molecular vibrations and as chemical and physical „fingerprint of molecules can be interpreted. The recognition of real information content in spectra is often not easy, in order to extract the information effectively different transformation and chemometric procedures can be used.

Effective chemometric methods needed in pharmaceutical and biotechnological practices even because the spectrum is the only source of information input. Bacterial fermentations were effectively monitored qualitatively using on-line fiber optic probes.

A közeli infravörös spektroszkópiai és mikroszkópiai módszerek gyorsaságuk, roncsolás-mentes jellegük és nagy információ tartalmuk valamint áteresztőképességük miatt a gyógyszer előállítás és ellenőrzés hatékony, perspektivikus mérés technikái.

Hivatkozások

1. McClure, W.F. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2003**, *11*, 487–518.
2. Davies, A.M.C. *NIR news* **2005**, *16*, 9–11.
3. Savitzky, A.; Golay M.J.E. *Anal. Chem.* **1964**, *36*(8), 1627–1639.
4. Norris, K.H. *Extracting information from spectrophotometric curves. Predicting chemical composition from visible and near-infrared spectra. In Food Research and Data Analysis*, Ed by Martens H., Russwurm H. Jr., Applied Science Publishers Ltd: Barking **1983**, pp. 95–113.
5. Martens, H.; Jensen, S.A.; Geladi, P. *Multivariate linearity transformations for near-infrared reflectance spectrometry. In Proceedings from Nordic Symposium on Applied Statistics*, Stokkand Forlag Publishers, Stavanger **1983**, pp. 205–233.
6. Geladi, P.; MacDougall, D.; Martens, H. *Appl. Spectrosc.* **1985**, *39*, 491–500.
7. Mahalanobis, P.C. *Proc. Natl. Acad. Sci., India* **1934**, *2*, 49–55.
8. Kaffka, K.J.; Gyarmati, L.S. *J. Near Infrared Spectrosc.* **1998**, *6*, A191–A200.
9. Kaffka, K.J.; Seregély, Zs. *Acta Aliment. Hung.* **2002**, *31*, 3–20.
10. Martens, H.; Næs, T. *Multivariate calibration*, John Wiley & Sons Ltd: Chichester, **1991**.
11. Salgó, A.; Gergely, S. *J. Cereal Sci.* **2012**, *56*, 31–38.
12. Gergely, S.; Párta L.; Salgó A. *Monitoring of fermentation broths operated with E. coli cells—what is measured by near infrared spectroscopy? In Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 14th International Conference*, Ed by Saranwong S., Kasem-sumran S., Thanapase W., Williams P., IM Publications LLP, ISBN 978-1-906715-03-8, pp. 735–739 (**2010**).
13. Párta, L.; Gergely, S.; Salgó, A. *Pioneer experiences on PAT implementation of pharmaceutical biotech process development. In Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 15th International Conference* (in press).
14. Blanco, M.; Villar, A. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, *92*, 823–830.
15. Lewis, E.N.; Carroll, J.E.; Clarke, F. *NIR news* **2001**, *12*, 16–18.

Quantitative calibration equations were developed and validated for testing source/sink effects of materials (substrate, intermedier, metabolite, optical density) during fermentation procedure.

NIR microscopy as imaging technology was used in the detection of material's homogeneity of tablets as well as in finding and demonstration of adulteration.

Based on the fast, non-destructive and high throughput character of these techniques the NIR spectroscopic and microscopic technologies are efficient and perspective methods can be used in production and quality control of pharmaceutical products.

A tömegspektrometria alkalmazása fehérje alapú gyógyszerek szerkezetvizsgálatára és jellemzésére

HEVÉR Helga,¹ LUDÁNYI Krisztina,² DRAHOS László,³ és VÉKEY Károly^{3,*}

¹ Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt., Szerkezetkutatási Osztály; 1103 Budapest, Gyömrői út 19-21.

² Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézet; 1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 7.

³ MTA Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet; 1025 Budapest, Pusztaszeri út 59-67.

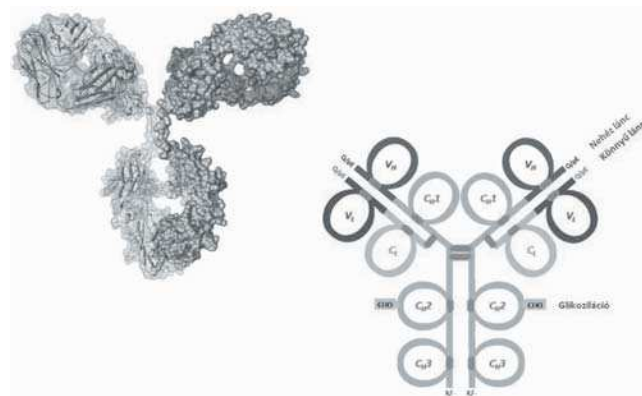
Bevezetés

A gyógyszerek új generációját képviselik a rekombináns technológiával előállított, fehérje alapú készítmények, melyek évről évre a gyógyszerforgalom egyre növekvő hányadát teszik ki világszinten.¹ Ezeket biológiai gyógyszerkészítményeknek, biologikumoknak nevezzük. Hatóanyaguk genetikusok és biomérnökök által tervezett; baktériumok, emlőssejtek vagy más élő organizmusok által, szigorúan szabályozott bioreaktorokban kifejezett komplex fehérjék. A jelenleg engedélyezett és forgalomban lévő biologikumok többségének hatóanyaga monoklonális antitest típusú fehérje (mAb). Ezek szerepére és fontosságára a 19. század végén figyeltek fel. Emil von Behring és Shibasaburo Kitasato² igazolták, hogy fertőzőes megbetegedésekből felépült betegek véréből nyert szérummal azonos betegségben szenvedő páciensek kezelhetők. Ezzel a készítménnyel, prevenció céljából, egészséges emberek szervezetét is immunizálni lehetett.

A fehérjealapú gyógyszerek tulajdonságai, ezek jellemzése, valamint a jellemzésükre szolgáló módszerek jelentősen eltérnek attól, mint amelyeket a gyógyszeriparban általában szintetikus eredetű kismolekulák esetén alkalmaznak. Jelen kontextusban „kismolekulának” nevezzük a 2000 Da-nál (de legtöbbször 500 Da-nál is) kisebb tömegű molekulákat. A kisméretű (hagyományos) gyógyszer-molekulák esetén a vegyület szerkezete, polimorf módosulata(i), esetleges szennyezői, természetes metabolitjai, és ezek farmakokinetikája jól ismertek. Jellemzésük elsősorban kémiai-analitikai módszereken alapul; ezen eszközök tárháza rendkívül széles.³ A szerkezetjellemezés talán legfontosabb eszköze a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR); e mellett a tömegspektrometria (MS) és az optikai spektroszkópiás módszerek is jelentősek. A szennyezők, metabolitok kimutatásának alapeszköze a kromatográfia és a tömegspektrometria; ezek egyre inkább integrált műszeregyüttest alkotnak (GC-MS, HPLC-MS). Fehérjealapú gyógyszerek esetén a helyzet jelentősen bonyolultabb. Sokszor már a fehérje szerkezete sem egyértelmű, a gyógyszer nagyszámú homológ keveréke; jellemzésük sokkal bonyolultabb.

Tágabb értelemben biologikumnak nevezünk minden készítményt, melynek aktív hatóanyagát egy élő organizmus állítja elő.⁴ Ide sorolhatóak tehát a vakcinák, a vérkészítmények, és a rekombináns úton előállított fehérjéket tartalmazó gyógyszerek egyaránt. Egy élő szervezet működésének és termeltetésének szabályozása rendkívül komplex folyamat, mind a mai napig kiemelt

kutatási terület, sok megválaszolatlan kérdéssel. Mint minden élő szervezet, ezek az expressziós rendszerek is érzékenyen reagálnak minden változásra, olykor drasztikus eltéréseket/mutációkat eredményezve ezzel a kifejezett fehérje szerkezetében. Szerkezetkutatási szempontból megvizsgálva a biologikumokat, összevetve a kismolekulás hatóanyagokkal, az első szembetűnő különbség a hatóanyag-molekula mérete és „homogenitása”. Egy monoklonális antitest elsődleges szerkezete több mint 1300 aminosavból, közel 25 000 atomból épül fel, melyek két „nehéz” és két „könnyű” láncba rendeződve alakítják ki az antitestekre jellemző Y formát a köztük létrejövő diszulfid hidak segítségével (1. ábra). Ha a fehérje expressziója során spontán lejátszódó pontmutációkkal nem is számolunk, még akkor is jelentős heterogenitást adnak a kifejezett fehérjemolekulák szerkezetének az egyes aminosavakon a translációt követően kialakuló módosítások (ko-transzlációs [CTM] és poszt-transzlációs módosítások [PTM]). Az antitestek három jellegzetes módosítása a nehéz lánc glikozilációja, a láncok N-terminálisának piroglutaminációja, valamint a nehéz lánc C-terminálisán található lizinek jelenléte vagy hiánya. Minden lehetőséget figyelembe véve a potenciális heterogén formák száma megközelítőleg 10^8 nagyságrendű, melyek minden egyes gyártási tételben jelen vannak/lehetnek.



1. Ábra. IgG1 típusú monoklonális antitestek általános szerkezete (Az [5, 6]hivatkozások alapján).

A fehérjék méretéből és heterogenitásának mértékéből adódóan a kismolekulás szerkezetmeghatározási gyakorlattal összevetve az egyes nagyműszeres szerkezetkutatási technikák is teljesen új szerepkört nyernek. Jelenleg elképzelhetetlen, hogy egy intakt monoklonális antitest NMR-es vizsgálata alapján olyan részletesen és pontosan leírt szerkezetet lehessen megadni, mint egy kis szerves molekula

* email: vekey.karoly@ttk.mta.hu

esetében. Többdimenziós mérések alapján ~10 000 ¹H és ~3 500 ¹³C atom korrelációit feltérképezni kivitelezhetetlen feladat lenne még akkor is, ha csak tisztán egy adott típusú izomer lenne a kezünkben. Fehérjék szerkezetének, ezen belül is szekvenciájának és módosításainak jellemzése során ezért elsődleges szerkezetmeghatározási technikává lép elő a tömegspektrometria különböző elválasztástechnikai módszerekkel, elsősorban a HPLC-vel kapcsolva.

A jelenleg használt szerkezetvizsgálati és analitikai módszerek fejlesztése hosszú időn keresztül kismolekulák meghatározására specializálódott. A fehérjeanalitikai feladatok megjelenésével elsődleges feladattá vált „nagy molekula-kompatibilissé” fejleszteni a kismolekulás analitikai módszereket. Egy kis szerves molekula akár egyetlen infravörös spektrum (IR) alapján is azonosítható. A fehérjék elsődleges szerkezetének és módosításainak rutinszerű ellenőrzésére kidolgozott eljárás ennél sokkal bonyolultabb. Erre szolgál pl. a peptidterkép analízis, ahol egy ultraibolya (UV) kromatogram alapján eldönthető, hogy megfelel-e a vártak az előállított hatóanyag. Peptidterkép analízis során a kromatográfiás elválasztást egy összetett mintaelőkészítés előzi meg, melynek során a fehérjét „konzervatív” peptidokra hasítjuk, jellemzően proteolitikus úton (egy fehérjebontó enzim, ún. proteáz segítségével), majd a keletkezett „peptid-elegy” komponenseit kromatográfiásan elválasztjuk. Az így kapott UV kromatogram ujjlenyomatszerűen jellemző a fehérje elsődleges szerkezetére és módosításaira egyaránt. Ahhoz, hogy ez az UV kromatogram önmagában használható legyen a jellemzésre, mindenekelőtt teljes szerkezetmeghatározást kell végezni az adott fehérjére. Azonosítani kell, hogy az adott ujjlenyomat pontosan melyik fehérjéhez rendelhető; valamint elengedhetetlen a kromatográfiás elválasztás során eluálódó komponensek mindegyikének azonosítása. Ez elsődlegesen a kromatográfiához „on-line” kapcsolt tandem tömegspektrometriával történik (HPLC-MS/MS). A kromatográfiás csúcshoz aminosav szekvenciákat, poszt-transzlációs módosulásokat tudunk társítani, vagyis egzakt szerkezeti információt kapunk. A peptidterkép analízis példája jól szemlélteti, hogy a fehérjék karakterizálása során alkalmazott analitikai eljárások két csoportra oszthatóak. A módszerek egy része egyedi ujjlenyomatot képes készíteni a vizsgált fehérjéről, tehát jól jellemezhet egy adott gyártási terméket. Ilyen eljárás például a peptidterkép analízis, a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD), esetleg NMR spektroszkópia. Az analitikai módszerek másik csoportját alkotják azok a technikák, melyek konkrét szerkezeti információt nyújtanak a vizsgált fehérjéről. Ide sorolható a fehérjék területén jelenleg egyedülálló, meghatározó szerepet betöltő tömegspektrometria, de ide tartozik kisebb (tipikusan izotóppal jelölt) fehérjék NMR analízise is.

Ebben a kérdéskörben fontos megemlíteni a generikus, ill. „biohasonló” termékeket is. Generikus termék esetén (egyéb követelmények mellett) kémiai értelemben azonos szerkezetű molekulákról van szó. Fehérje alapú gyógyszerek esetén nem beszélhetünk szerkezet-azonosságról, csak nagyfokú hasonlóságról; részben azért, mert e termékeket (pl. a poszt-transzlációs módosulások miatt) nagyfokú szerkezeti heterogenitás jellemzi. Ezért fehérjealapú gyógyszerek esetén az eredeti termékkel azonos hatású, szerkezeti jellemzőit tekintve kis tolerancián belül azonosnak tekinthető termékeket biohasonlóknak, vagy

bioszimilárisoknak nevezzük. A másolatot elkészítéséhez elengedhetetlen az eredeti „originális” termék („molekula”) részletes ismerete. Kismolekulás gyógyszerekkel ellentétben fehérjealapú gyógyszerek esetén ezek szerkezete (ill. szerkezeti jellemzői) nem nyilvános; a szakirodalomban (pl. publikációban) megjelenő információk hiányosak, olykor félrevezetőek lehetnek.⁷ Ennek következtében az analitikus számára egy „bioszimiláris” termék analitikája gyakran egy eredeti termék kifejlesztésénél, jellemzésénél is nagyobb kihívást jelent.

A gyógyszeriparban dolgozó fehérjeanalitikus számára a kritériumokat mindig az aktuális hatóságok fogalmazzák meg (OGYI, EMA, FDA, stb.), azonban ez sohasem olyan egyértelmű, mint ahogy azt egy felhasználó szeretné. A hatósági irányelveknek megfelelően a fehérjék jellemzését a lehető legnagyobb részletességgel („to the extent possible”) és a legkorszerűbb „state of the art” analitikai technikákkal kell megvalósítani. Ez egyaránt igaz a biológikumokat és a biohasonlókat gyártók számára.

A tömegspektrometria alkalmazása fehérjék (fehérje alapú gyógyszerek) vizsgálatára

A tömegspektrometria, különösen korszerű elválasztástechnikával kapcsolva, az egyik legszélesebb körben alkalmazott és leghatékonyabb analitikai módszer. Gyógyszeranalitikai alkalmazása széleskörű, a kutatásban, a készítményfejlesztésben és a minőségbiztosításban egyaránt nélkülözhetetlen. A 20. század végére a hagyományos gyógyszerkutatáson túlmenően bioanalitikai célokra is kulcsfontosságú technikává nőtte ki magát. Ezen fejlődésnek köszönhetően a fehérjekutatás (és ezen a belül fehérjealapú gyógyszerek fejlesztése) napjainkban elképzelhetetlen tömegspektrometria nélkül. A proteomika az élő szervezetben előforduló fehérjék szerkezetének, biológiai funkciójának, a fehérjék mennyiségi előfordulásának és ezek térbeli és időbeli változásának feltérképezése. Ennek kulcsfontosságú analitikai eszköze a tömegspektrometria, mely különböző elválasztástechnikai eszközökkel kapcsolva teremt lehetőséget komplex biológiai minták kvalitatív és kvantitatív analízisére. Rutinszerű alkalmazását két új ionizációs eljárás kidolgozása tette lehetővé: a „Matrixszal segített Lézer Deszorpció Ionizáció” (MALDI) és az elektroporlasztásos ionizáció (ESI). A készülékek és az adatfeldolgozás (speciális szoftverek) területén az utóbbi évtizedben robbanásszerű technikai fejlődés következett be.

A gyógyszeriparban megjelenő fehérjeanalitikai feladatok megoldására a proteomikában kidolgozott eszközrendszer szolgál alapul, de a két kutatási terület célkitűzéseinek fókuszpontja jelentős mértékben különbözik. Míg a klasszikus proteomikai kutatásban a feladat nehézségét a biológiai mátrix komplexitása és a meghatározandó fehérjék rendkívül kis mennyisége jelenti, ezek a problémák nem jelennek meg a rekombináns úton, nagy tételben előállított és tisztított fehérje alapú hatóanyagok esetében. Klasszikus proteomikai publikációkban elfogadott, hogy a vizsgált mintában azonosítottak tekinthető egy fehérje, ha MS és tandem MS (MS/MS) spektrumok alapján megfelelő számú, „jellegzetes” peptid igazolja szekvenciáját. Tipikus esetben a fehérje szekvenciájának 30-50%-a határozható meg, de minor komponensek azonosítására 1-2 peptid azonosítása is

elegendő lehet. Ezzel szemben a gyógyszeripari feladatok esetén nem a fehérje kimutatása, jelenlétének igazolása a cél, hanem lehető legteljesebb karakterizálása: a vizsgált fehérje (1) teljes aminosav szekvenciájának igazolása terminálistól terminálisig, aminosavról aminosavra történő meghatározása; (2) az aminosav szekvenciájában megjelenő összes módosítás (CTM, PTM) típusának és helyének meghatározása; (3) egy adott aminosavon megjelenő módosítás esetén (pl. glikoziláció esetén) az egyes homológ szerkezetek arányának meghatározása; (4) a molekulatömeg meghatározása; (5) a térszerkezet kialakításában résztvevő diszulfid hidak meghatározása, stb.

A tömegspektrometria (tandem-tömegspektrometria) segítségével nyert információkat, függetlenül a vizsgált molekula méretétől és egyéb fizikai-kémiai tulajdonságaitól, két csoportra oszthatjuk. Az MS spektrum alapján a vizsgált molekula molekulatömege határozható meg, míg fragmentációs, vagyis MS/MS spektruma(i) alapján szerkezeti információt nyerhetünk róla a keletkezett fragmens ionok molekulatömege alapján. A fragmentáció elősegítésére legelterjedtebben alkalmazott módszer, kis és nagymolekulák esetén egyaránt, az ütköztetési aktiválás (CID). Ebben az esetben az ütköztetési cellában inert gázzal (pl. N₂, He, Ar) ütköztetjük az ionokat).^{8,9} Lehetőség van infravörös lézerrel is gerjeszteni az ionokat (IRMPD, Infrared Multiphoton Dissociation),¹⁰ de ez a technika kevésbé elterjedt. Több szempontból is komplementer technikáknak tekinthetők az elektronbefogás indukálta disszociáció (ECD) és az elektron transzferrel indukált disszociáció (ETD), melyek kifejezetten fehérjék, peptidok vizsgálatára fejlesztett fragmentáció eljárások. Ebben az esetben az ionok disszociációját a többszörös töltésű ionok - kis energiájú elektronok, vagy gyökionok segítségével indukált - töltésszámának csökkenése váltja ki. Egyik legnagyobb előnyük a CID technikával szemben, hogy a fragmentáció során a módosítások nem fragmentálódnak, ezzel lehetőséget teremtve pontos pozíciójuk lokalizálására (pl.: glikoziláció, foszforiláció). Mind a kismolekulákat, mind a nagymolekulákat jól definiált fragmentáció jellemzi. Proteinek MS/MS spektrumának értékelése napjainkban különböző algoritmusok alapján működő szoftverek segítségével történik. Ezek nagyrészt automatikus, esetenként félautomatikus értékelést tesznek lehetővé. Proteinek teljes aminosav-sorrendjének meghatározása nem tipikus proteomikai feladat, de biológikumok és bioszimiláris készítmények esetén alapvető jelentőségű. Az értékelés manuális feladat, bár gyakran szoftver segíti (lásd később).

A fehérjék MS alapú szerkezetmeghatározása alapvetően kétféleképpen valósítható meg.¹¹ Egyik lehetőség az ún. „top-down” szekvenálási stratégia, amikor a tömegspektrométerrel a teljes fehérjemolekulát vizsgáljuk. Ebben az esetben az MS spektrum alapján meghatározható a fehérje/polipeptid mérete (molekulatömege), fragmentációja alapján pedig az aminosav sorrend és az esetleges poszt-transzlációs módosulások típusa és helye. Ez az eljárás a technikai nehézségek miatt napjainkban még nem tekinthető rutineljárásnak, kisebb fehérjék, polipeptidok jellemzésére alkalmas.

A fehérjék leggyakrabban használt szerkezetmeghatározási módszere az ún. „bottom-up” eljárás, melynek során a

tömegspektrometriás analízist több lépcsős mintaelőkészítés előzi meg. A fehérjét optimális esetben 8-14 aminosavat tartalmazó peptidre hasítjuk jellemzően nagy specificitású fehérjebontó enzimekkel, úgynevezett proteázokkal. A proteomikában legelterjedtebben használt enzim a tripszin, mely két bázikus aminosav, a lizin és az arginin C-terminálisánál hasítja az összekapcsolódó aminosavakat. A természetben megtalálható fehérjékben gyakori a lizin és az arginin előfordulása, amely a fehérjeanalízis szempontjából kedvező. A tripszines emésztés további előnye, hogy (specifikus működése esetén) minden kihalított peptid C-terminálisán egy bázikus aminosav marad, biztosítva ezzel a peptid megfelelő protonálhatóságát a tömegspektrometriás analízishez. A teljes fehérjeszekvencia meghatározásához a tripszines emésztés sokszor nem elegendő, ezért a fehérjék emésztéséhez gyakran más proteázokat (pl. Glu-C, stb) is alkalmazunk. Ezeket az enzimeket párhuzamos kísérletekben, vagy egy lépésben alkalmazzuk (enzimkeverékként). Az így kapott peptid keveréket kromatográfiás elválasztást követően, lehetőség szerint a peptidokat izolálva juttatjuk a tömegspektrométerbe. Az egyes komponensek MS/MS spektrumának értékelésével meghatározzuk a peptidok szerkezetét, a teljes aminosav sorrendet (szekvenciáját), amely a fehérje elsődleges szerkezete. Egy fehérje tömegspektrometriás analízise során sok ezer spektrumot (ill. tandem tömegspektrumot) veszünk fel, melyek értékelése elképzelhetetlen speciálisan erre a célra fejlesztett szoftver nélkül. Ez azonban gyógyszeripari feladatok esetén csak háttértámogatást nyújt, mivel minden egyes peptid, szekvencia, módosítás azonosítása kizárólag a spektrumok manuális értékelését követően tekinthető megoldottnak.

Napjainkban a technológia rohamos fejlődésének köszönhetően a „bottom-up” és „top-down” stratégiák közötti átmenet is egyre népszerűbb, melyet „middle-down” vagy „middle-up” eljárásnak nevezünk. Ez esetben a fehérjét csak néhány helyen hasítjuk, és az így kapott, még mindig nagy (3-10,000 Da molekulatömegű) polipeptid láncokat szekvenáljuk.

A fent ismertetett módszerek fehérjék módosításainak azonosítására és helyspecifikus analízisére is használhatók. Szerencsés esetben már az enzimatis emésztést követő HPLC-MS/MS analízis során azonosítható, és egy peptidre lokalizálható a módosítás. Egyes módosítások, mint például a glikoziláció feltérképezése azonban igen bonyolult feladat, több tömegspektrometriás technika, speciális mintaelőkészítés, különleges kromatográfiás módszerek együttes alkalmazását igényli.

Fehérjék glikozilációja és ennek meghatározása

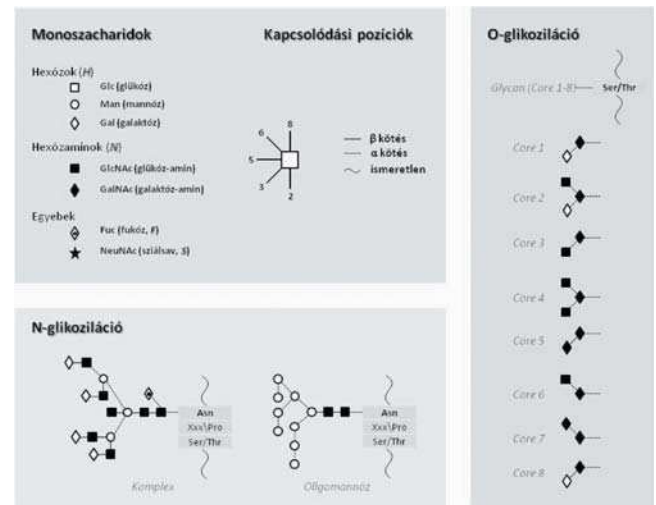
A fehérjeanalitika, ill. fehérje alapú gyógyszerkészítmények jellemzésének egyik legnagyobb kihívása a glikoziláció meghatározása. A glikoziláció a fehérjék leggyakoribb, transzlációt követően kialakuló enzimatis módosítása (CTM vagy PTM), mely széles körben képes befolyásolni a fehérje hatását, biológiai aktivitását, valamint a sejtek közötti kommunikáció és immunválasz egyik fő eszköze. A cukorláncok szerkezete és funkciója közötti összefüggések feltárása, a glikozilációs mintázat monitorozása betegségek előrejelzésében, diagnosztikájában vagy korfejlődésének

követésében kiemelkedő fontosságú kutatási területek. A felsorolt célok megvalósításához rendkívül precíz és érzékeny analitikai háttér szükséges, mely a mai korszerű műszerezettség mellett is nagy kihívást jelent a cukormintázat rendkívüli összetettsége miatt. A cukorlancok komplexitását építőköveinek, a különböző monoszacharid egységek fajtájának változatossága, illetve ezek kapcsolódási rendjének és kötéstípusainak sokszínűsége adja. A glikozilációs típusok két leggyakoribb fajtája az N- és O-glikoziláció.

N-glikoziláció során a cukorlanc valamely láncközi aszparagin (Asn/N) láncközi amid csoportjának nitrogén atomjához kapcsolódik. A fehérje elsődleges szerkezetében egy aminosav-hármas, úgynevezett konszenzus szekvencia jelzi az N-glikoziláció lehetőségét, melynek mintázata: N-X-S/T, ahol X bármely aminosav lehet a prolin (Pro/P) kivételével, S szerint, a T treonint jelent. Az aszparagin oldalláncára az endoplazmás retikulumban, enzimatisz uton épül rá egy nagyobb cukor egység. Többlépéses folyamatban jön létre a glikoproteinek jellemző N-cukorszerkezetek valamelyike: komplex; oligomannóz (2. ábra); vagy a két típus keveréke, a hibrid cukorlanc.

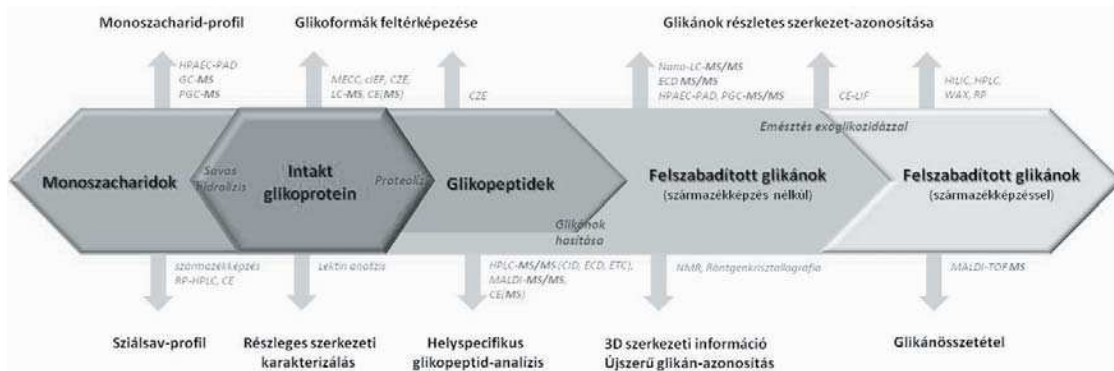
O-glikoziláció az oldalláncukban hidroxil csoportot tartalmazó aminosavakon alakulhat ki, melyek közül a szerin és a treonin a leggyakoribbak. Az O-glikánok

szerkezetét tekintve nyolc alaptípust különböztetünk meg, melyek mindegyikére jellemző, hogy a fehérje lánchoz egy N-acetilhexozaminon keresztül kapcsolódik a cukorlanc.



2. Ábra. Az N- és O-glikoziláció jellemző cukorszerkezetei (A [3] hivatkozás 2. ábrája alapján).

Rekombináns monoklonális antitestek esetében, tipikusan egyetlen N-glikozilációs módosítás épül be a fehérje nehéz láncának konstans régiójába, általában a 297-es pozícióban



3. Ábra. A glikozilációs mintázat meghatározásának lehetőségei ([12] hivatkozás 1. ábrája és a [13] hivatkozás 2.2.59.-1. ábrája alapján).

Rövidítések magyarázata (amelyek eddig nem szerepeltek a cikkben): HPAEC-PAD: nagy hatékonyságú anioncserés kromatográfia pulzáló amperometriás detektálás, PGC: porózus grafit-kromatográfia, MECC: micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia, cIEF: kapilláris izoelektromos fókuszálás, CE: kapilláris zónaelektroforézis, CE-LIF: kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcencia detektálással, HILIC: hidrofíli kölcsönhatáson alapuló folyadék kromatográfia, WAX: gyenge anion cserélő, RP-HPLC: fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia, TOF: repülési idő analízator.

található aszparaginra. A monoklonális antitestek előállítása tipikusan emlősejtes expressziós rendszerben történik (pl.: kínai hörcsög petefészek sejtes [CHO]). Bakteriális expressziós rendszerek épp azért nem használhatók, mivel ezek nem képesek (megfelelően) glikozilálni a kifejezett fehérjét. A rekombináns monoklonális antitestek glikozilációs mintázatát főtömegében négy fő glikoforma, úgynevezett komplex típusú cukorlanc alkotja. Ezek mellett kisebb mennyiségben számos más, úgynevezett minor glikoforma is jelen van.

A terápiás glikoproteinek biológiai aktivitását befolyásoló tényezők egyike a glikozilációs mintázat. A természetben előforduló glikoproteineken található cukorlancok pontos funkciója sok esetben még mai napig sem tisztázott, azonban számos glikoziláció – hatás összefüggést tártak már

fel biológiai vizsgálatok segítségével. Továbbá a cukorlanc befolyásolja a fehérje konformációját, stabilizálhatja térszerkezetét, antitestek esetében befolyásolja a fehérjék aktivitását (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity és Complement Dependent Cytotoxicity), stb.

Humán gyógyászati felhasználásra előállított glikoproteinek esetében feltétlenül szükséges (és a hatóságok által megkívánt) a glikozilációs mintázat lehető legteljesebb karakterizálása. Ez többek között magában foglalja a glikoziláció helyének azonosítását (mely különösen O-glikoziláció esetében nehéz), az adott helyen található minor és major glikoformák azonosítását és kvantifikálását, a cukorlancokat felépítő monoszacharid egységek kapcsolódási rendjének feltérképezését és a fehérje egészére jellemző monoszacharid összetétel meghatározását. Különösen fontos a glikoproteint jellemző számos glikoforma relatív

mennyiségi jellemzése; ill. egy adott termék esetén ennek az eloszlásnak (a glikozilációs mintázatnak) az állandósága (kis variabilitás a mennyiségi arányokban). A glikoziláció analitikai jellemzése igen bonyolult, számos módszer együttes alkalmazását igényli. A teljes munkafolyamatot a 3. ábra szemlélteti.

Fehérjék N-glikozilációs mintázatának meghatározása – esettanulmány

A glikozilációs mintázat meghatározása a glikoziláció vizsgálatának egyik legfontosabb (de önmagában nem elegendő) lépése, amelyre több alternatív megoldás létezik, ezek mindegyike komplex munkamódszert igényel. A feladat illusztrálására egy ilyen munkafolyamatot mutatunk be a következőkben. Alapelemei:¹⁴

- 1) A glikoprotein proteolitikus (általában triptikus) emésztése;
- 2) A peptid-glikopeptid keverék UHPLC-MS és UHPLC-MS/MS analízise
- 3) Az eredmények értékelése speciális, a glikozilációs mintázat meghatározására szolgáló szoftver segítségével.

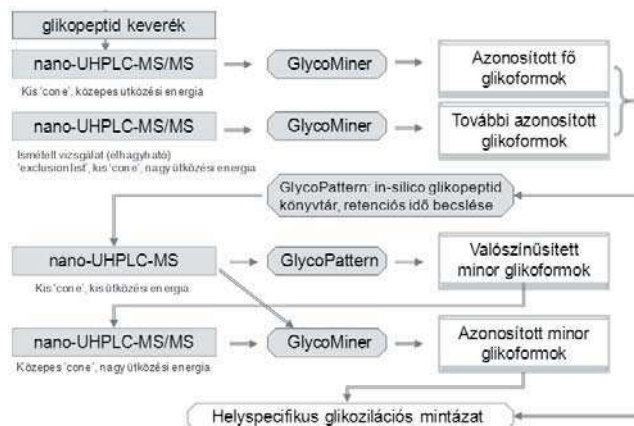
A vizsgálat stratégiai szempontból fontos eleme, hogy glikopeptid (és nem oligoszaccharid) fragmensek analízisét végezzük el. Ennek során a peptid molekulatömege (és szükség esetén szekvenciája is) meghatározható, amely azonosítja, hogy az adott glikopeptid mely proteintól származik, ill. azt, hogy a glikoziláció a fehérjelánc mely helyén történt. A módszer előnye, hogy a szennyezett minták ill. glikoprotein keverékek analízise úgy végezhető el, hogy a szennyezés jelenléte az eredményeket nem befolyásolja.

A vizsgálat másik eleme a peptid/glikopeptid keverék analitikai és szerkezetvizsgálati jellemzése. Ez kromatográfiával „on-line” kapcsolt tömegspektrometriai vizsgálat során történik; amely a modern analitikai kémia egyik legnagyobb teljesítőképességű módszere. A sikeres analízis érdekében a tömegspektrometriás méréseket a „szokásos” proteomikai módszerekhez képest jelentősen eltérő körülmények között kell elvégezni (lásd lentebb).

A vizsgálat harmadik kulcskérdése az eredmények értékelése. Ennek során meg kell határozni, hogy egy kromatográfiás futás alatt felvett sok ezer tömegspektrum (és tandem tömegspektrum) közül melyik felel meg a glikopeptidnek. Miután azonosítottuk a glikopeptidek jelenlétét, tandem tömegspektrumuk alapján meghatározzuk ezek szerkezetét (aminosav és monoszaccharid összetételét), majd az azonosított glikopeptidek relatív mennyiségét. Mindezen lépések manuális értékelése a gyakorlatban nehezen megvalósítható – ez a glikoprotein analízis egyik szűk keresztmetszete –, ezért a probléma megoldásához két szoftvert („GlycoMiner” és „GlycoPattern”-t) fejlesztettünk ki.^{14, 15}

A fenti eljárás folyamatát a 4. ábra mutatja be. A glikoprotein enzimatis emésztését követően több, kromatográfiás szempontból megegyező mérés kerül lefuttatásra, melyek a tömegspektrometriás beállításokban, ionizációs és fragmentációs paraméterek tekintetében különböznek egymástól.

Az ionizációs paraméterek beállításától függően az ionizáció során keletkezett ionok az ionforrásban gyakran elbomlanak (fragmentálódnak). Ez olykor kívánatos (szerkezeti információt nyújt), glikopeptidek analízise esetén azonban célszerű elkerülni, ugyanis az eredményeket torzíthatja. Glikopeptidek egyik fontos tömegspektrometriás jellemzője, hogy a cukorláncot felépítő monoszaccharid egységek közötti kötések jóval könnyebben



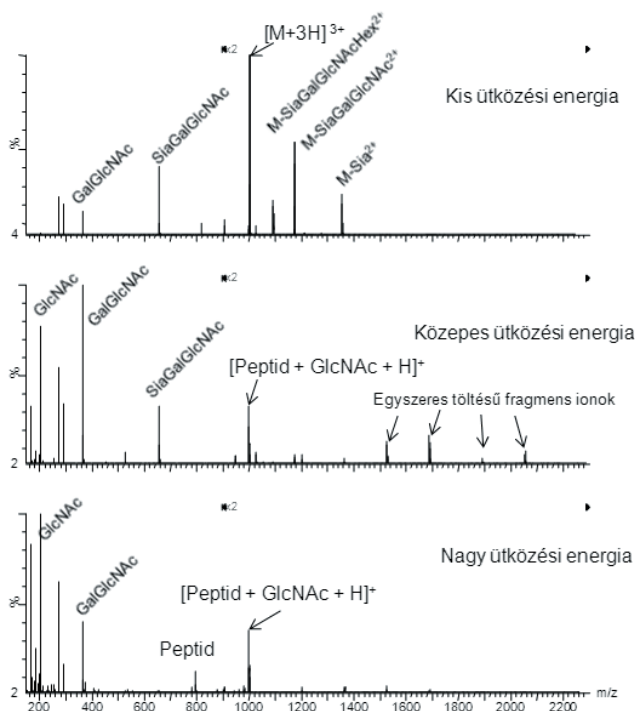
4. Ábra. Az N-glikozilációs mintázat meghatározásának folyamatábrája (A [14] hivatkozás alapján).

elhasadnak, mint a peptidrészt felépítő aminosavak közötti peptidkötések. Amennyiben már az ionizáció során fragmentáció következik be, ez olyan ionokat eredményez, melyek látszólag egy kisebb cukorláncot tartalmazó glikopeptid jelenlétére utalnak. Ezen tömegspektrumok értékelése a glikoprotein mintában jelenlévő glikoformák típusáról és azok relatív arányáról is félrevezető információt ad. A készülék beállítása szempontjából ezért fontos, hogy a glikopeptidek szerkezetének és mennyiségi arányának meghatározásához olyan kísérleti körülményeket válasszunk, mely esetén az ionforrásban fragmentáció nem történik.

Az előzőekkel szemben, az ionforrásban bekövetkező fragmentáció előnyt is jelenthet. Amennyiben az ionforrásban (az úgynevezett „cone” feszültség megnövelésével) jelentős mértékű fragmentációt idézünk elő, ez intenzív oxónium ionok kialakulásához vezet (pl.: 204 m/z HexNac, m/z 306, Hex.HexNac; m/z 657 Sia.Hex.HexNac, stb). Ezen markerionok megjelenése glikopeptidek jelenlétét mutatja; így felhasználható ezek lokalizálására (retenciós idejük azonosítására). Tömegspektrometriás szempontból a módszerfejlesztés első lépése tehát a megfelelő ionizációs paraméterek optimalizálása. Glikopeptidek analízise esetén gyakran nem egy, hanem két különböző ionizációs körülményt állítunk be, az egyik a glikopeptidek jelenlétének és retenciós idejének azonosítására, a másik ezek szerkezetvizsgálatára és kvantitatív jellemzésére alkalmas.

A fragmentációs energia nemcsak az ionforrásban, hanem tandem tömegspektrometriás szerkezetvizsgálatok esetén is döntő fontosságú. Tandem tömegspektrometria esetén tipikusan ütközéses aktivációt végzünk, ez esetben az ütközési energia a legfontosabb paraméter. Ennek megfelelő beállításával ill. változtatásával különböző szerkezeti információkat gyűjthetünk a glikopeptidről, részben a

cukorlánc szerkezete is meghatározható (szekvenciája, elágazási helyei). Egy glikopeptid energiafüggő tandem spektrumait mutatja az 5. ábra. Elsődlegesen a cukorlánc fragmentációja figyelhető meg, ami lehetőséget nyújt a cukorlánc szerkezetének feltérképezésére. Nagy ütközési energia esetén a deglikozilált peptid ionja is megjelenik a spektrumban, mely a peptid tömegét azonosítja. Mivel a mintában lévő glikoprotein(ek) ismertek (ill. rutin HPLC-MS/MS alapú proteomikai módszerek alkalmazásával felderíthetők), a peptid tömege tipikusan ennek szerkezetét, így a glikoziláció helyét is azonosítja. Szükség esetén ECD segítségével a peptidszekvencia a tömegspektrumból közvetlenül is meghatározható.

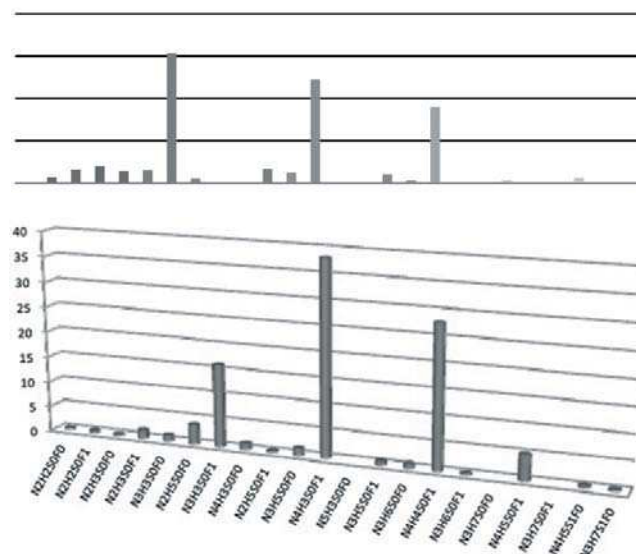


5. Ábra. A CID ütközési energia hatása egy glikopeptid fragmentációs mintázatára (A [14] hivatkozás alapján).

A bemutatott HPLC-MS(MS) mérésorozat alkalmazásával monoklonális antitestek is jól vizsgálhatók. Ennek segítségével meghatároztuk egy kereskedelmi forgalomban levő, humán gyógyászati felhasználásra gyártott monoklonális antitest, az Infliximab glikozilációs mintázatát (6. ábra). A bemutatott diagram jól szemlélteti a mAb-okra jellemző négy fő glikoforma (G0F: N4H3S0F1, G1F és G1F': N4H4S0F1, G2F: N4H5S0F1) meglétét. A vizsgálati módszer érzékenységét jelzi, hogy mindezek mellett számos más, igen kis (1%-nál kisebb) mennyiségben jelenlévő variánst (glikoformát) is azonosítottunk. A glikozilációs mintázat ilyen részletes feltérképezése nemcsak a kész hatóanyag jellemzése során elengedhetetlen, de hatalmas támogatás nyújthat a technológia követésében és fejlesztésében egyaránt.

Összefoglaló

A gyógyszerkutatás rendkívül fontos új irányzata a fehérje alapú gyógyszerkészítmények kifejlesztése. Ezek



6. Ábra. Egy humán gyógyászati felhasználásra előállított monoklonális antitest, az Infliximab glikozilációs mintázata.

szerkezetének jellemzése és analitikája nagy kihívás, a műszeres analízis oldaláról új megoldások kialakítását követeli meg. A kutatás egyik legfontosabb eszköze a tömegspektrometria (ill. a folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria), mely a fehérjék elsődleges szerkezetének és módosításainak meghatározására alkalmas (alap)eszköz. Monoklonális antitestek (és más proteinek) gyakori módosulata a glikoziláció, melynek szerkezeti jellemzése a fehérjeanalitika egyik legnehezebb feladata. A glikoziláció meghatározására leggyakrabban tömegspektrometriás módszereket alkalmaznak. A jelen cikk a tömegspektrometrián alapuló fehérjeanalitika legfontosabb jellemzőit foglalja össze, és egy példán keresztül szemlélteti a glikozilációs mintázat meghatározásának lehetőségeit.

Referenciák

1. Aggarwal, S. *Nat Biotech* **2011**, *29*, 1083-1089.
2. An, Z. *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, in: Wiley: New York, **2009**.
3. Harris, R.; Chin, E.; Macchi, F.; Keck, R.; Shyong, B.-J.; Ling, V.; Cordoba, A.; Marian, M.; Sinclair, D.; Battersby, J.; Jones, A.S. *Analytical Characterization of Monoclonal Antibodies: Linking Structure to Function*, in: S.J. Shire, W. Gombotz, K. Bechtold-Peters, J. Andya (Eds.) *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*, Springer: New York, **2010**, pp. 193-205.
4. *Questions and Answers on biosimilar medicines* (similar biological medicinal products), EMEA, London, 22 October **2008**, Doc. Ref. EMEA/74562/2006 Rev. 1 in.
5. Dillon, T.M.; Bondarenko, P.V.; Speed Ricci, M. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1053*, 299-305.
6. Zhang, Y.; Cui, W.; Zhang, H.; Dewald, H.D.; Chen, H. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 3838-3842.
7. *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: Quality issue*; EMEA, London, 22 February **2006**, EMEA/CHMP/BWP/49348/2005, in.
8. Cooks, R.G. *Collision Spectroscopy*, in: Plenum Press: New York, **1978**.
9. McLuckey, S.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 599-614.

10. Thorne, L.R.; Beauchamp, J.L. in: M.T. Bowers (Ed.) *Gas Phase Ion Chemistry*, Academic: New York, **1984**, pp. 41.
11. Bogdanov, B.; Smith, R.D. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 168-200.
12. Marino, K.; Bones, J.; Kattla, J.J.; Rudd, P.M. *Nature Chemical Biology* **2010**, *6*, 713-723.
13. European Pharmacopoeia 7.0, *Glycan Analysis of Glycoproteins*, 01/2011:20259, in.
14. Ozohanics, O.; Turiak, L.; Puerta, A.; Vekey, K.; Drahos, L. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1259*, 200-212.
15. Ozohanics, O.; Krenyacz, J.; Ludanyi, K.; Pollreisz, F.; Vekey, K.; Drahos, L. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, *22*, 3245-3254.

Rezgési optikai aktivitás – Abszolút konfiguráció és konformáció meghatározása

TARCZAY György,^{a,b,*} VASS Elemér,^{c,*} GÓBI Sándor,^{a,b} és MAGYARFALVI Gábor^{a,b}

^aMolekulaspektroszkópai Laboratórium, ELTE Kémiai Intézet, Pázmány P. s. 1/a, 1117 Budapest, Magyarország

^bELTE TTK – MTA TTK Környezeti Kémiai-Fizikai Laboratórium, Pázmány P. s. 1/a, 1117 Budapest, Magyarország

^cKiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratórium, ELTE Kémiai Intézet, Pázmány P. s. 1/a, 1117 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Becslések szerint az 1950-es évek végén, 1960-as évek elején mintegy 10–20 ezer végtag nélküli, vagy fejletlen végtagú csecsemőt hoztak napvilágra azok a nők, akik a terhességi rosszulletre a Contergan nevű gyógyszer szedték. Az 1980-as években derült egyértelműen fény arra, hogy a rendellenességet az okozta, hogy a királis Thalidomide hatóanyagot a gyógyszer racém keverékként tartalmazta; a gyógyszerhatást az egyik enantiomer fejté ki, míg a születési rendellenességért a másik enantiomer a felelős. Ugyan a felelős gyógyszergyár csak 2012-ben kért nyilvánosan bocsánatot, ez a tragédia már az utóbbi 2–3 évtizedben a gyógyszerkémia kulcsfontosságú területei közé emelte az abszolút konfiguráció meghatározását, a királis elválasztásokat és az enantiomerszelektív szintézisek fejlesztését.

Ebben a közleményben az abszolút konfiguráció meghatározásának egy újabb, kevésbé ismert, de véleményünk szerint az egyik legperspektivikusabb módszer családját mutatjuk be, amelyet összefoglalóan rezgési optikai aktivitásnak (vibrational optical activity, VOA) nevezünk. Ebbe a családba két módszer, a rezgési cirkuláris dikroizmus (vibrational circular dichroism, VCD) és a Raman optikai aktivitás (Raman optical activity, ROA) tartozik. A két módszer potenciálját mutatja az is, hogy 2010 végén egyetemi és műszergyártói összefogásban megnyílt a European Centre for Chirality nevű intézet,¹ amely az alaputatások, valamint a műszeres és elméleti módszerek fejlesztése mellett cégeknek is vállal VOA módszereken alapuló abszolút konfiguráció meghatározást. A tapasztalatok alapján egyértelműen kijelenthető, hogy kis és közepes méretű, merev molekulák esetében egyértelműen ma már a VCD (és ROA) technika a legolcsóbb, leggyorsabb és legmegbízhatóbb módszer abszolút konfiguráció meghatározására.

A kézirat írásakor Magyarországon csak az ELTE Kémiai Intézete rendelkezik VCD és ROA spektrométerrel, amely a régióban egyedülálló vizsgálati lehetőségeket biztosít. Tudomásunk szerint a Budapesti Műszaki Egyetemen építés alatt áll egy VCD készülék, de egyetemek és gyógyszergyárak kutató részlegei is érdeklődnek a módszer iránt. Cikkünk nem titkolt célja ezért az is, hogy a két módszer teljesítőképessége mellett, az ELTE műszerezettségét, lehetőségeinket is bemutassuk. Mivel a műszereken, különösen a VCD készüléken végzett alaputatásainkról már más aspektusban beszámoltunk a

Magyar Kémiai Folyóiratban megjelent közleményekben,^{2–4} ezért ezekről csak röviden ejtünk szót.

2. A rezgési optikai aktivitás alapjainak áttekintése

Az optikai aktivitás (vagy kirotikai) vizsgálatok a királis molekulák és a síkban vagy a cirkulárisan polarizált fény közötti kölcsönhatást vizsgálják. Egy síkban polarizált fény nyaláiban az egyes fotonoknak megfelelően elektromágneses hullámok elektromos tér vektorai egy síkban helyezkednek el, míg a cirkulárisan polarizált fény esetében az elektromos tér vektora térben és időben körbe jár. Attól függően, hogy a körbejárás a forrás irányába nézve órajárással megegyező vagy azzal ellentétes irányú, jobbra (pozitív), vagy balra (negatív) cirkulárisan polarizált fényről beszélünk. Kémiai szóhasználatnál élve a jobbra és balra cirkulárisan polarizált fény nyalábok egymás „enantiomer párjai”. A cirkulárisan polarizált fény előállítható olyan két azonos irányba terjedő, de elektromos tér vektorait tekintve egymásra merőleges hullámból, (azaz két egymásra merőleges síkban polarizált fény nyalábból,) amelyekben az egyik hullám 90°-os fáziskésésben van a másikhoz képest. Ha nem pontosan 90°-os a fáziskésés, akkor ún. elliptikusan polarizált fényt kapunk.

2.1. Reszgési optikai aktivitás (VCD)

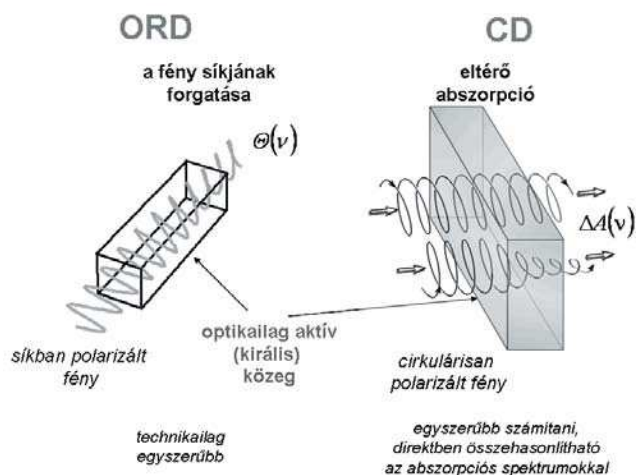
A síkban polarizált fény és a királis molekula kölcsönhatásakor az optikailag aktív molekula elforgatja az elektromágneses tér síkját. A hullámhossz függvényében mért forgatást optikai rotációs diszperzióknak (ORD) nevezzük.

A cirkulárisan polarizált fény esetében a jobbra és balra cirkulárisan polarizált fény eltérő abszorpcióját figyelhetjük meg. A fény hullámhosszának függvényében mért abszorpciókülönbséget (egységnyi koncentráció és úthossz esetében ez a rotátorerősség) cirkuláris dikroizmus (CD) spektrumnak nevezzük. Ennek megfelelően a CD spektrumokban olyan hullámhossznál találunk pozitív vagy negatív sávot, ahol a sávok az abszorpciós (például UV-látható vagy IR) spektrumban is jelentkeznek. Az UV-látható tartományban a kétféle cirkulárisan polarizált fény között mérhető abszorpciókülönbség nagyságrendileg ezred, az IR tartományban pedig tízezered–százezered része az abszorpciónak. Az enantiomerek CD spektrumai a hullámhossz tengelyre tükörszimmetrikusak.

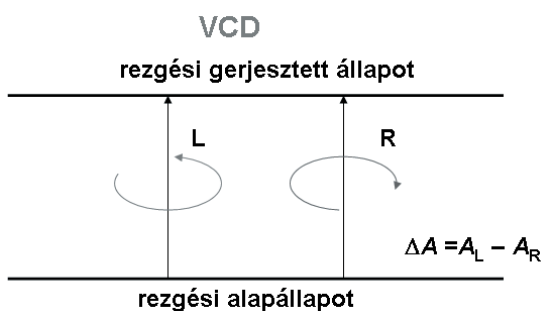
* Főszerzők. Tarczay György Tel.: +36 1 372 2500/6587; fax: +36 1 372 2592; e-mail: tarczay@chem.elte.hu;

Vass Elemér Tel.: +36 1 372 2500/1654; fax: +36 1 372 2592; e-mail: evass@chem.elte.hu

Az ORD és CD módszerek összehasonlítása az 1. ábrán látható. Megmutatható (képzetes törésmutatók használatával), hogy egy vegyület ORD görbéje és a CD spektruma nem független egymástól. Elvileg, a teljes CD spektrum (0-tól ∞ hullámhosszig) ismeretében a teljes ORD spektrum kiszámolható. Ez az állítás fordított irányban is igaz. A két spektrum közötti átszámítás az ún. Kramers-Kronig transzformációval⁵ lehetséges.



1. Ábra. Az ORD és a CD spektroszkópia.



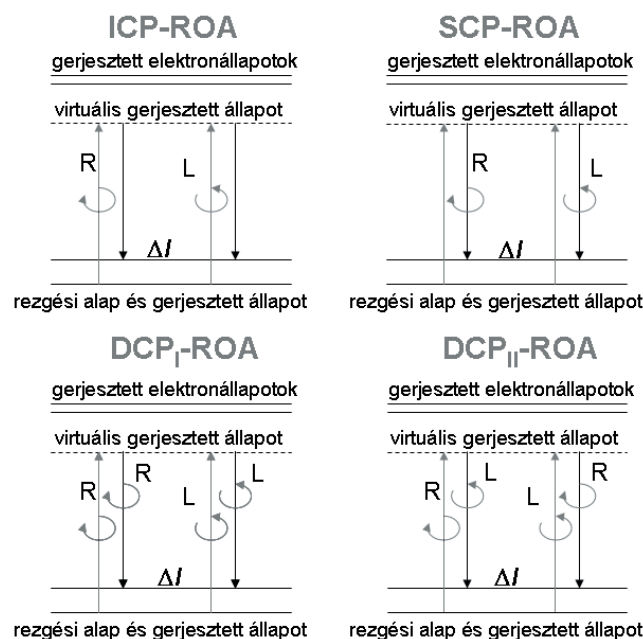
2. Ábra. A VCD spektroszkópia elve.

Az UV-látható fény tartományában általában elektrongerjesztést vált ki a fény, ezért az ebben a tartományban felvett CD spektrumokat gyakran elektronikus CD (ECD) spektrumnak is lehet tekinteni. Hasonlóan, az infravörös fény tartományában rezgési (vibrational) VCD spektroszkópiáról beszélünk. Az IR és VCD spektroszkópia tehát ugyanolyan viszonyban áll egymással, mint az UV-Vis és CD spektroszkópia, csak a vizsgálati tartomány eltérő. A VCD módszer elvét a 2. ábra mutatja.

2.2. Raman optikai aktivitás (ROA)

A fentiek alapján kézenfekvő, hogy a VCD spektroszkópia egyszerű analógiájára a Raman spektroszkópiának is létezik kiroptikai megfelelője, ez a Raman optikai aktivitás (ROA). ROA kísérletet többféleképpen is elvégezhetünk. Elvileg legegyszerűbb módszer, ha a besugárzó (incident) lézertény cirkulárisan poláris. Ha a kétféle cirkulárisan polarizált fényvel besugárzott királis mintáról szóródó polarizálatlan fény intenzitáskülönbségét mérjük a hullámhossz függvényében, akkor az ICP-ROA spektrumhoz jutunk. Ha a besugárzó fény polarizálatlan, és a szórt (scattered) fényben vizsgáljuk meg a kétféle cirkulárisan polarizált fény

intenzitásának a különbségét a hullámhossz függvényében, akkor SCP-ROA spektrumhoz kapunk. Végezhetünk olyan kísérletet is, amelyben a besugárzó fény is cirkulárisan poláris és a szórt fényben is a kétféle cirkulárisan polarizált fény intenzitáskülönbségét vizsgáljuk. Ez a kétszeresen (dual) cirkulárisan polarizált módszer, a DCP-ROA. A DCP_I-ROA esetében a jobbra cirkulárisan polarizált fényvel besugárzott mintáról szóródó jobbra cirkulárisan polarizált fény intenzitásából vonjuk ki a balra cirkulárisan polarizált fényvel besugárzott mintáról szóródó balra cirkulárisan polarizált fény intenzitását. A DCP_{II}-ROA esetében pedig a jobbra cirkulárisan polarizált fényvel besugárzott mintáról szóródó balra cirkulárisan polarizált fény intenzitásából vonjuk ki a balra cirkulárisan polarizált fényvel besugárzott mintáról szóródó jobbra cirkulárisan polarizált fény intenzitását. A négyféle ROA alapmérést tekinti át a 3. ábra.



3. Ábra. A ROA spektroszkópiai módszerek elve.

A négyféle ROA spektrum elvileg egyenértékű, de a gyakorlatban az ICP-ROA, az SCP-ROA és a DCP_I-ROA spektrumok között kis eltérés mutatkozik. További variációt jelent az is, ha az SCP-ROA esetében a beeső, vagy ha az ICP-ROA esetében a vizsgált szórt fény nem polarizálatlan, hanem lineárisan polarizált. Szintén elvileg is különböző spektrumokhoz jutunk, ha a besugárzó és a szórt fény közötti szöveget változtatjuk. A gyakorlatban leginkább az SCP-ROA módszert és „hátraszórt” geometriát (a besugárzó és a szórt fény 180°-os szöveget zár be) használják. Így működik az egyetlen kereskedelemben kapható készülék is.

3. Történeti áttekintés

3.1. Az optikai aktivitás felfedezésének és alkalmazásának mérföldkövei

Több mint 200 éve, 1811-ben, a fény polarizációját vizsgáló francia természettudós, François Jean Dominique Arago azt észlelte, hogy ha síkban polarizált fehér fény útjába egy kvarckristályt, ezután pedig egy polarizátort helyez, akkor a

polarizátor után színes fény jelenik meg. Megmutatta, hogy a szín függ a polarizátornak a belépő polarizált fény síkjához viszonyított helyzetétől.⁵⁻⁸

Egy évvel később további kísérletekre alapozva, Jean-Baptiste Biot megmutatta, hogy az Arago-féle kísérlet két független jelenséggel magyarázható. Az egyik az optikai rotáció, azaz az a jelenség, hogy a kvarc elforgatja a polarizált fény síkját. A másik jelenség pedig az ún. optikai rotációs diszperzió, azaz az, hogy az elforgatás mértéke függ a síkban polarizált fény hullámhosszától.⁹ Kísérletei során Biot azt is észlelte, hogy kétféle kvarckristály létezik, amelyek ellentétes irányban forgatják a fény síkját.

1815 szintén Biot írta le elsőként, hogy optikai forgatást oldatokkal is el lehet érni; észlelte a terpentinolaj¹⁰ és a kámfor alkoholos, valamint a cukor vizes¹¹ oldatának optikai forgatását. Ezek a kísérletek megmutatták, hogy a kvarccal ellentétben (melynek olvadáka nem forgatja a fény síkját), ezekben a kísérletekben az optikai forgatás molekuláris, nem tömbfázishoz tartozó tulajdonság.

1817-ben, Aragot megelőzve, Augustin-Jean Fresnel elsőként állított elő cirkulárisan polarizált fényt.¹² 1847-ben az osztrák geológus-minerológus, Wilhelm Karl Ritter von Haidinger, észlelte elsőként, hogy az ametiszt eltérő mértékben nyeli el a jobbra és balra cirkulárisan polarizált fényt.¹³ Közel négy évtizeddel később, 1895-ben, Aimé Auguste Cotton észlelte réz- és króm-tartarát oldatokban a kétféle cirkulárisan polarizált fény eltérő elnyelését.¹⁴

Az optikai forgatás IR tartománybeli kimutatásával a XX. század közepén kezdtek intenzíven foglalkozni. A japán JASCO cég már 3 éve megépítette az első UV-látható fény tartományában működő, az optikai diszperziós (ORD) görbe felvételére alkalmas automata spektropolariméterét, amikor korábbi reprodukálhatatlan kísérletek után, 1964-ben Leonard I. Katzin elsőként mutatta meg a kvarckristály optikai forgatásnak hullámhosszfüggését a közeli IR tartományban.¹⁵

Az első kereskedelmi, UV-látható fény tartományában működő CD készüléket 1965-ben hozta forgalomba a JASCO. Ekkor még nemcsak a VCD és ROA kísérleti megfigyelése, de még ezek elméletének kidolgozása is váratott magára.

A Cambridge-i Egyetemen Buckingham és Barron a ROA elméletét fekteti le egy 1971-ben megjelent tanulmányban,¹⁶ míg egy évvel később Holtzwarth és Chabay (University of Chicago) közli az első elméleti modellt VCD spektrumok számítására.¹⁷ Ezután már a kísérleti eredményekre sem kellett sokáig várni. 1973-ban Barron, Buckingham és Bogaard felveszi az első (artifaktumoktól mentes) ROA spektrumot (az α -feniletaminról),¹⁸ amit Werner Hug és munkatársai reprodukálnak 1975-ben.¹⁹ 1974-ben pedig Holtzwarth és munkatársai közlik az első VCD spektrumot (a 2,2,2-trifluorometil-1-feniletanolról),²⁰ amit Nafie, Cheng és Stephens (University of South Carolina) független kísérlete igazol egy évvel később.²¹

A technikai nehézségeknek köszönhető, hogy az első sikeres VCD és ROA méréseket követő 30–40 évben ezek a mérések

egyedi építésű készüléken történtek. Az első, 1997-ben kereskedelmi forgalomba kerülő VCD készüléket a Bomem (később BioTools), az első ROA készüléket pedig a BioTools hozta forgalomba 2003-ban. Jelenleg ROA készüléket csak a BioTools (ChiralRAMAN-2X), Fourier-transzformációs VCD készüléket vagy FT-IR spektrométerhez csatlakoztatható VCD kiegészíthető egységet ma már a BioTools (ChiralIR-2X spektrométer), a Bruker (PMA-50 kiegészítő egység), a Thermo Scientific (kiegészítő egység), és a JASCO (FVS-6000 VCD spektrométer és FVT-4000 kiegészítő egység) is forgalmaz. A kiegészítő egység beszerzése mellett az szól, hogy a már meglévő FT-IR spektrométert felhasználva kisebb beruházással juthatunk mérési lehetőséghez, és a készülékegyüttest sokrétűbben használhatjuk. A komplett VCD készülékek fő előnye pedig az, hogy ezek a készülékek kizárólag VCD mérésre optimaláltak, a kiegészítő egységekhez képest általában jobb minőségű spektrumok felvételét teszik lehetővé.

A kereskedelmi készülékek késői megjelenésével magyarázható, hogy az ezredfordulón még a két-két tucatot sem érte el a VCD és ROA elméletével foglalkozó, vagy e módszereket használó kísérleti tanulmányok száma. Az évezred első évtizedének második felére VCD-vel foglalkozó cikkek száma meghaladta az évi 100-at, míg ROA tartalmú cikkek kb. 50 jelent meg ebben az időszakban. Annak ellenére, hogy a VOA módszerek az alap kutatásban is csak az utóbbi évtizedben terjedtek el, a nagyobb gyógyszergyárak már most felismerték a két módszer nyújtotta páratlan lehetőségeket, a komoly előnyöket más abszolút konfiguráció meghatározására alkalmas módszerekkel szemben. A nagyobb gyógyszergyárak között például a GlaxoSmithKline, a Bristol-Myers Squipp Co., a Wyeth/Pfizer, az Eli Lilly, és az AstraZeneca már kb. tíz éve rutinszerűen használja a VCD technikát.¹ A VCD-vel történt abszolút konfiguráció meghatározásokat az amerikai gyógyszergyártást felügyelő szervezet, az FDA (Food and Drug Administration) is hivatalosan elismeri.¹

3.2. A módszerek elterjedése Magyarországon és az ELTÉ-n

Elsősorban a kiroptikai módszerek használatát 1970-ben Humboldt-ösztöndíjasként Hamburgban Günther Snatzke mellett elsajátító Kajtár Márton iskolateremtő munkájának köszönhető, hogy ezek a módszerek hamar megjelentek Magyarországon, ezen belül az ELTÉ-n. Az első ORD spektropolariméter 1967-ben, az első UV-látható tartományban működő CD spektrométer 1971-ben került beszerzésre, ezeket modernebb készülékek váltották 1989-ben, majd 2001-ben. Időközben a CD-spektroszkópia több magyarországi egyetemen (Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Debreceni Egyetem, Semmelweis Egyetem, Szegedi Tudományegyetem) és akadémiai kutatóintézetben (MTA TTK Enzimiológiai Intézet, MTA TTK Molekuláris Farmakológiai Intézet) valamint a gyógyszeriparban (Richter Gedeon) is meghonosodott.

Az ELTE VCD készüléke (Bruker Equinox55 FT-IR PMA37 VCD egységgel) 2003 óta, míg a ROA (BioTools ChiralRAMAN-2X) készülék 2011 vége óta áll szolgálatban.

4. A rezgési optikai aktivitás elmélete

A közlemény terjedelmi korlátai miatt nem vállalkozhatunk arra, hogy részletesen tárgyaljuk a VCD és ROA spektrumok számításának elméletét. Ugyanakkor mindkét módszer esetében a mérések csak megbízható elméleti számításokkal összevetve adnak szerkezeti információt. Nincsenek a VCD sávok előjelét a szerkezetből megjósolni képes empirikus szabályok, ezért a számítások a módszerek elválaszthatatlan részét képezik. Az alábbi két alfejezetben csak rövid bevezetőt tudunk nyújtani, illetve a számításokra alkalmas programcsomagokat mutatjuk be. Az elméleti háttérrel alaposabban a [5,6,22,23] referenciákban ismerheti meg az érdeklődő olvasó.

4.1. A VCD spektroszkópia elmélete

Rosenfeld már a kvantummechanika hajnalán, 1928-ban közölte²⁴ a cirkuláris dikroizmus jelenségének leírásához szükséges formulát, ami érvényes az elektromágneses sugárzás bármely, így az UV-látható és IR tartományában is:

$$R_{ab} = \text{Im}\{\langle a|\boldsymbol{\mu}_e|b\rangle\langle b|\boldsymbol{\mu}_m|a\rangle\} \quad (1)$$

Ez alapján egy 'a' és 'b' állapot közti átmenethez tartozó rotációerősséget a kérdéses rendszert leíró elektromos és mágneses dipólusoperátorok segítségével lehet kiértékelni. Az operátorok a magok és az elektronok dipólus hozzájárulását is tartalmazzák.

Mint ahogy tükrözés hatására a mágneses operátor előjelet vált, enantiomer párok esetében azonos nagyságú és ellenkező előjelű rotációerősséget ad a számítás. Akirális molekulák esetén a rotációerősség zérus, ezért a képletben szereplő skalárszorzat tényezőinek, az elektromos és mágneses átmeneti momentumoknak egymásra merőleges vektoroknak kell lenniük.

Az alapvető összefüggések ismeretének ellenére a VCD rotációs erősségek kiértékelése nem vált lehetségessé az alkalmazott kvantumkémia és a számítógépek elterjedésével. A Rosenfeld-formula egyszerűsége ellenére is sok buktatót rejt. Rezgési állapotok esetén például mind az atommagok, mind az elektronok hozzájárulása az átmeneti dipólokhoz számottevő. Az elektronok hozzájárulását egyszerűbb kiértékelni, ha a molekula rezgéseit harmonikusnak, a rezgési torzulások hatását az elektromos dipólusmomentumra pedig lineárisnak tekintjük (kétszeresen harmonikus közelítés).

Az igazán komoly problémát a mágneses momentum viselkedése jelenti. Ugyanis a diamágneses molekulák stacionárius alapállapotában az elektronoknak nincs hozzájárulása a rendszer mágneses momentumához tetszés szerinti molekulageometria esetén sem. Ennek megfelelően a molekularezgésekhez társítható átmeneti mágneses momentumok csak az atommagok mozgásából származnának, ami nem adja vissza a fizikai valóságot.

A tökéletlen leírás mögött ez esetben sajnos a kvantumkémia egyik legalapvetőbb közelítése, a Born–Oppenheimer-közelítés áll. Azzal, hogy a magok és elektronok mozgását egymástól függetlennek vesszük, épp az elektronok mágneses momentumának kritikus tényezőjét hanyagoltuk

el. Minthogy a Born–Oppenheimer-közelítés, az eddig kifejlesztett kvantumkémiai módszerek alapköve, hosszú ideig csak heurisztikus és elég pontatlan módszereket tudtak alkalmazni a rotációerősségek számítására.

A fordulatot jelentő lépést Stephens tette meg.²⁵ A Born–Oppenheimer-közelítésen túllépve levezetett egy olyan kifejezést az elektronok mágneses átmeneti momentumára, amelyben csak az elektron-alapállapotot jellemző mennyiségek (történetesen analitikus deriváltak) szerepelnek. Ezeket a Born–Oppenheimer-közelítést használó programokkal is ki lehetett értékelni.

A VCD spektrumok gyors és megbízható számítása ma már számos programcsomagba be van építve. Legelőször a Gaussian programcsomagban jelent meg a rotációerősségek sűrűségfüggő (DFT) szintű számítása.^{26,27} A Dalton programcsomaggal Hartree-Fock (HF) és multikonfigurációs (MCSCF) módszereket használhatunk.²⁸ Szintén alkalmasak VCD spektrum számítására az ADF (DFT szinten)^{29,30} és a PQS (HF és DFT)^{31–33} programcsomagok is. A Gaussian programcsomaggal lehetőség az oldószerhatás is figyelembevételére. A legújabb eredmények nyomán a rezgési anharmonicitás VCD intenzitásokra gyakorolt hatását is figyelembe lehet venni, és a rezgési felhangok és kombinációs sávok rotációerősségét is lehet számolni.³⁴

A számítások eredményeként legtöbbször a rezgési sávok előjelét vetik össze a mérésekkel. Az általában megbízhatóan tekinthető elméleti végeredmény több tényezőből épül fel, abszolút értékben is kicsi és a számolás sok paraméterére is érzékeny lehet. Előfordulhat, hogy a VCD spektrum sok sávjából nem mindegyiknél adódik egyezés. Nicu és Baerends vezette be a sávok robusztusságának fogalmát,³⁵ amivel ezt a megfeleltetést könnyítik meg. Ugyanis lehetőség van arra, hogy csak a számítások alapján, a priori jelezzük, hogy az egyes sávok mennyire érzékenyek a molekula szerkezetének, vagy a számítás paramétereinek változására. Bár az eredeti szerzők által használt kritérium szerencsétlenül volt kiválasztva, a megbízhatóság hasonló előrejelzése fontos és hasznos, mert a nem robusztus sávokat és előjelüket az asszignáció során el lehet hanyagolni.

Nicuék megbízhatósági paraméterként az elektromos és mágneses átmeneti momentumok vektora által bezárt szöget választották. Ez akirális anyagoknál 90° kell legyen, ezért a derékszögtől távoli (<60°) szögek esetén tekintettek csak robusztusnak egy sávot. Valós sávok esetén azonban sajnos ez a szög nem jól definiált, nem egy mérhető fizikai mennyiség, hisz a mágneses momentumvektor iránya és nagysága függ a számításban használt koordináta-rendszerrel is, csak a mágneses és az elektromos momentumok skalárszorzata független a koordináta-rendszer megválasztásától.

Csoportunk definiált és bevezetett^{36,37} egy alternatív (és korrekt) megbízhatósági paramétert, ami tapasztalataink szerint megkönnyíti az összetett spektrumok egyértelmű hozzárendelését, hisz intenzívebb sávokról is meg tudja mutatni, hogy nagyon könnyen válhatnak előjelet.

$$\zeta_k = \frac{|\boldsymbol{\mu}_{m,k}| \cos \zeta}{|\boldsymbol{\mu}_{e,k}|} = \frac{R_k}{D_k} \quad (2)$$

Ez két fizikai mennyiségnek, az k -dik sáv rotátorerősségének és dipólerősségének aránya. Az átmenetimomentumvektorokat tekintve azt mutatja meg, hogyan viszonyul az elektromos átmeneti momentumvektor ($\mu_{e,k}$) nagyságához a mágneses átmeneti momentum vele azonos irányba mutató komponense. ζ a két vektor variábilis szöge. Akkor nem lesz egy sáv ez szerint robusztus, ha a kicsi és bizonytalan mágneses átmeneti dipólus ellenére nagyobb a rotátorerőssége a sáv igen magas dipóluserőssége miatt.

4.2. A ROA spektroszkópia elmélete

A Raman-szórás első közelítésben a fény, mint elektromágneses sugárzás elektromos tere (\mathbf{E}) és a molekula polarizálhatósága (α) közötti kölcsönhatásként lehet leírni. A fény hatására időben változó indukált elektromos dipólusmomentum (μ) jön létre. β -irányú elektromos tér a következő α irányú indukált elektromos dipólt indukálja:

$$\mu_{e,\alpha} = \alpha_{\alpha\beta} E_{\beta}. \quad (3)$$

Az elektromos tér a besugárzó fény frekvenciájával (ν_0) időben változik:

$$E_{\beta} = E_0 \sin 2\pi\nu_0 t; \quad (4)$$

míg a polarizálhatóság a molekularezgések frekvenciájával változik az időben. Harmonikus közelítésben az i -dik normálrezgés hatása a polarizálhatóságra:

$$\alpha_{\alpha\beta} = \alpha_{0,\alpha\beta} + \alpha_{1,\alpha\beta} \sin 2\pi\nu_i t. \quad (5)$$

Behelyettesítve a következő egyenletet kapjuk:

$$\begin{aligned} \mu_{e,\alpha} &= E_0 (\alpha_{0,\alpha\beta} + \alpha_{1,\alpha\beta} \sin 2\pi\nu_i t) \sin 2\pi\nu_0 t = \\ &= \alpha_{0,\alpha\beta} E_0 \sin 2\pi\nu_0 t + \\ &+ \frac{1}{2} \alpha_{1,\alpha\beta} E_0 \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_i) t + \\ &+ \frac{1}{2} \alpha_{1,\alpha\beta} E_0 \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_i) t, \end{aligned} \quad (6)$$

ahol az első tag a Rayleigh-szórás, míg az utolsó két tag a Stokes, illetve az anti-Stokes szórás adja meg. Klasszikus képben ez az időben változó dipól kelti a szórt elektromágneses sugárzást.

A fenti leírás azonban csak a Raman-szórás legnagyobb tagját adják meg, ami nem ad királis információt. Precízebb leírásban az indukált elektromos dipólt olyan sorfejtéssel fejezhetjük ki, amelyben a besugárzó fény mágneses terének (\mathbf{B}) hatása és magasabb rendű molekuláris tenzorok is szerepelnek. Abban az esetben, ha a fény hullámhossza távol van minden gerjesztés hullámhosszától:

$$\mu_{e,\alpha} = \alpha_{\alpha\beta} E_{\beta} + \frac{1}{2\pi\nu_0} G'_{\alpha\beta} \dot{B}_{\beta} + \frac{1}{3} A_{\alpha\beta\gamma} \nabla_{\beta} E_{\gamma} + \dots, \quad (7)$$

ahol \mathbf{G}' az elektromos dipól – mágneses dipól tenzor, \mathbf{A} pedig az elektromos dipól – elektromos kvadrupól tenzor.

Az időfüggő perturbáció-elmélet szerint a fent bevezetett három tenzor az 'a' és 'b' állapotok ismeretében a következőképpen számítható:

$$\alpha_{\alpha\beta} = \frac{2}{\hbar} \sum_{a \neq b} \frac{\omega_{ab}}{\omega_{ab}^2 - \omega_0^2} \operatorname{Re} \left(\langle a | \mu_{e,\alpha} | b \rangle \langle b | \mu_{e,\beta} | a \rangle \right), \quad (8)$$

$$G'_{\alpha\beta} = \frac{1}{\hbar} \sum_{a \neq b} \frac{\omega_{ab}}{\omega_{ab}^2 - \omega_0^2} \operatorname{Im} \left(\langle a | \mu_{e,\alpha} | b \rangle \langle b | \mu_{m,\beta} | a \rangle \right), \quad (9)$$

$$A_{\alpha\beta\gamma} = \frac{1}{\hbar} \sum_{a \neq b} \frac{\omega_{ab}}{\omega_{ab}^2 - \omega_0^2} \operatorname{Re} \left(\langle a | \mu_{e,\alpha} | b \rangle \langle b | \theta_{\beta\gamma} | a \rangle \right), \quad (10)$$

ahol a $\mu_{m,\beta}$ a β -irányú indukált mágneses momentum:

$$\mu_{m,\beta} = -\frac{1}{\omega} G'_{\alpha\beta} \dot{E}_{\beta} + \dots, \quad (11)$$

$\theta_{\alpha\beta}$ pedig az indukált elektromos kvadrupól momentum tenzoreleme:

$$\theta_{\alpha\beta} = A_{\alpha\beta\gamma} E_{\gamma} + \dots \quad (12)$$

A gyakorlatban (akár gáz, akár oldat vagy folyadék, vagy por minta vizsgálatok) a molekulák rendezetlenül, a tér minden irányba állhatnak. Ha statisztikusan átlagolunk minden orientációra, akkor a fenti egyenletekből csak két független izotróp:

$$\alpha = \frac{1}{3} (\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}), \quad (13)$$

$$G' = \frac{1}{3} (G'_{xx} + G'_{yy} + G'_{zz}) \quad (14)$$

és három független anizotróp paraméter adódik:

$$\beta(\alpha)^2 = \frac{1}{2} (3\alpha_{\alpha\beta} \alpha_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha} \alpha_{\beta\beta}), \quad (15)$$

$$\beta(G')^2 = \frac{1}{2} (3\alpha_{\alpha\beta} G'_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha} G'_{\beta\beta}), \quad (16)$$

$$\beta(A)^2 = \frac{1}{2} \omega \alpha_{\alpha\beta} \varepsilon_{\alpha\gamma\delta} A_{\gamma\delta\beta}, \quad (17)$$

ahol $\varepsilon_{\alpha\gamma\delta}$ a Levi-Civita permutációs jel. A fenti ún. ROA-paraméterekkel minden kísérleti összeállításra (SCP, ICP, DCP_I és DCP_{II}), és bármilyen szórási geometriára megadható a ROA intenzitás. A ROA intenzitáson (Δ) matematikailag a következőt értjük:

$$\Delta = (I^R - I^L) / (I^R + I^L), \quad (18)$$

ahol I^R és I^L a cirkulárisan jobbra és balra polarizált fény intenzitása. Visszaszórási geometria esetében például a következő ICP- és DCP_I-ROA intenzitások vezethetők le:²³

$$A(180^\circ, \text{ICP}) = \frac{48 \left[\beta(G')^2 - \frac{1}{3} \beta(A)^2 \right]}{2c \left[45\alpha^2 + 7\beta(\alpha)^2 \right]}, \quad (19)$$

$$A(180^\circ, \text{DCP}_I) = \frac{48 \left[\beta(G')^2 - \frac{1}{3} \beta(A)^2 \right]}{12c\beta(\alpha)^2}. \quad (20)$$

A 2.2 fejezetben említettük, hogy a szórás geometriájától is függ a ROA intenzitás. Példaként előre szórás esetében a következő ICP-ROA intenzitások adódnak:²³

$$\Delta(0^\circ, \text{ICP}) = \frac{8[45\alpha G' + \beta(G')^2 - \beta(A)^2]}{2c[45\alpha^2 + 7\beta(\alpha)^2]} \quad (21)$$

Ugyan a ROA spektrumok számítása a VCD spektrumokéhoz képest kevésbé rutinszerű, és jelentősen nagyobb számítógépes kapacitást igényel, az utóbbi években egyre effektívebb és gyorsabb kódok jelentek meg. A Gaussian programcsomaggal HF és DFT módszerekkel,²⁷ a DALTON programmal HF, DFT és MCSCF,^{28,38,39} a PSI4 kóddal⁴⁰ pedig már a jóval precízebb CC (coupled-cluster) módszerrel is,⁴¹ míg az ADF programcsomaggal DFT szinten, rezonancia közelében^{29,42} is számíthatunk ROA spektrumokat.

5. A VOA módszerek legfőbb előnyei a többi abszolút kiralitás meghatározására alkalmas módszerekkel szemben

Agyógyszerkémiaiában a legelterjedtebb abszolút konfiguráció meghatározási módszer az anomális röntgendiffrakció. Ez a módszer hosszabb előkészítést igényel, nehézatomot kell beépíteni a molekulába, vagy nehézatom ionjával kell sőt képezni, ezután egykristályt növesztetni. A vizsgálathoz tiszta anyagokra, sőt enantiomertiszta anyagra van szükség.

Királis shift reagensek segítségével az NMR spektroszkópia is lehetőséget nyújt az abszolút kiralitás meghatározására. Ehhez azonban elsőként a shift reagens és a vizsgált molekula között létrejövő sokszor bonyolult komplex térszerkezetét kell felderíteni. A feladat komplexitása miatt ez egy viszonylag ritkábban alkalmazott módszer.

Az UV-látható tartományban alkalmazott ECD (és ORD) spektroszkópia szintén régóta elterjedt módszer az abszolút konfiguráció meghatározásának gyakorlatában. A módszer mellett az egyszerű kivitelezhetőség, gyors mintaelőkészítés, rövid mérési idő, és az alacsony költségek szólnak. Ugyanakkor elengedhetetlen előfeltétel az, hogy a vizsgált molekulában jelen legyen egy kromofórcsoport. Nehézséget jelenthet az is, hogy korábban nem vizsgált molekula esetében a spektrumok értelmezéséhez a sávok előjelét empirikus szabályok, vagy ab initio módszerek segítségével ki kell számítani. Az empirikus szabályok sok esetben jól működnek, de nehéz előre megjósolni korlátaikat. Az ab initio számításoknál pedig az okoz nehézségét, hogy az elektronikus CD (ECD) spektrumok számításához gerjesztett állapotok számítására van szükség. Az alap elektronállapotú molekula tulajdonságaival szemben a gerjesztett állapotok számítása ma sem teljesen rutinszerű feladat, jóval nagyobb gyakorlatra és elővigyázatosságra van szükség. Mivel az ECD spektrumokban csak ritkán fordul elő több mint 2–3 sáv, ezért egy-egy sáv előjelének hibás becslése megbízhatatlan vagy rossz abszolút konfiguráció meghatározásához vezethet. Éppen a fenti nehézségek miatt a gyakorlatban elterjedt a módszer kombinálása olyan kémiai lebontással vagy átalakítással, amely már ismert konformációjú termékhez vezet. Ebben az esetben az abszolút kiralitás meghatározása már rutinszerűen elvégezhető a termék optikai rotációjának mérésével. Ugyanakkor az átalakítás időigényes, és nehézkessé teszi az, hogy racemizáció nem következhet be az átalakítás során.

A VCD és ROA spektroszkópiára szintén elmondhatók azok az előnyök, amelyek az ECD spektroszkópiát is

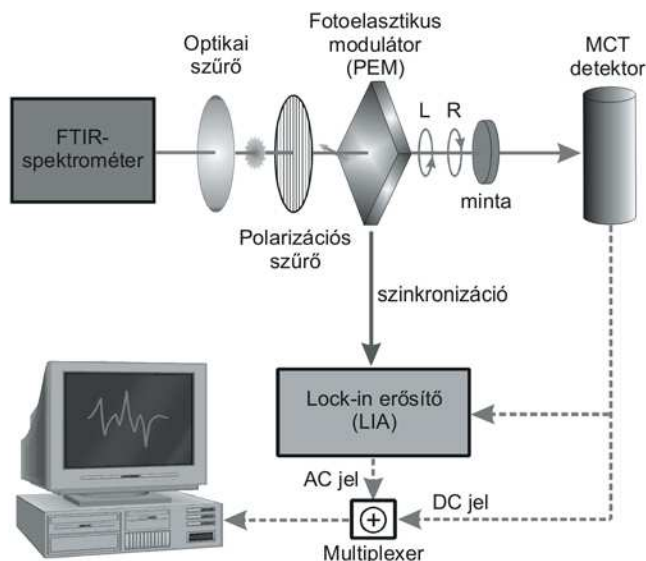
jellemzik; azaz olcsó és egyszerű a mintaelőkészítés, nincs szükség kristályosításra, shift reagensre. A mintának nem kell enantiomer tisztának lennie, mintegy 10%-os enantiomerfelesleg is elég a meghatározáshoz. Valamivel, de nem jelentősen hosszabb az átlagos mérési idő, mint ECD spektroszkópia esetében, ugyanakkor az ECD-vel szemben nincs szükség kromofórcsoportra és kémiai átalakításra sem. Ez egyrészt annak köszönhető, hogy a spektrumértékeléshez kvantumkémiai módszerekkel számított VCD és ROA spektrumok jóval megbízhatóbbak, mint a számított ECD spektrumok, mivel nincs szükség gerjesztett állapotok tulajdonságainak számítására (lásd 4. fejezet). Másrészt úgy a VCD, mind a ROA spektrumok sokkal részletgazdagabbak, mint az ECD spektrumok. A közepes és kis molekulák esetében is egy vagy akár több tucat sávra is lehet alapozni a konfiguráció meghatározását, azaz egy-egy rossz előjellel jelzett sáv nem befolyásolja számottevően az asszignáció megbízhatóságát. A VCD spektrumok értelmezésének megbízhatóságát az is növeli, hogy a számított előjelek és intenzitások mellett az egyes sávokhoz megbízhatósági faktort (lásd 4. fejezet) kapunk a számításokból.

Mivel a VCD és ROA spektrumok érzékenyebbek a konformációra, mint az ECD spektrumok, ezért flexibilis, multikonformációs molekulák esetében az abszolút konfiguráció meghatározása a konformációs eloszlás egyidejű meghatározásával lehetséges. Ez ugyan azt jelenti, hogy ilyen molekulák esetén az abszolút konfiguráció meghatározása nem rutinszerű, nagyobb gyakorlatot igényel, de egyben több információt is szolgáltat. A konformációval szembeni érzékenységük miatt a VOA módszereket az abszolút konfiguráció meghatározásán kívül – ismert vagy ismeretlen abszolút konfigurációjú vegyületek – konformációanalízisére is széleskörűen használják. Mivel a ROA esetében leggyakrabban használt oldószer a víz, ezért ez a módszer kiválóan alkalmas biomolekulák natív környezetben felvett térszerkezetének tanulmányozására is.

6. A VCD és ROA spektrométerek felépítése

6.1. A VCD készülék

A VCD spektrométer lényegében egy olyan módosított infravörös spektrométer, amely cirkulárisan polarizált infravörös sugárzás előállítására képes optikai eszközökkel van kiegészítve, és képes megmérni a királis minta balra- ill. jobbra cirkulárisan polarizált fényben mutatott abszorpciójának különbségét hullámszám függvényében. A manapság kereskedelemben forgalmazott készülékek mind Fourier-transzformációs elven működnek. Amint azt korábban említettük, a műszerek lehetnek dedikált FT-VCD vagy pedig Fourier-transzformációs infravörös spektrométerhez kapcsolható VCD feltétek. Az utóbbi esetben az alap FT-IR spektrométer tartalmazza a sugárforrást és az interferométert, a kilépő infravörös nyaláb szoftveres vezérléssel átirányítható a saját mintatérrel és detektorral rendelkező kiegészítő VCD modulba. Ezzel a megoldással találkozunk az ELTE TTK Kiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratóriumában, ahol egy Bruker Equinox55 FT-IR spektrométerből és egy PMA37 típusú VCD modulból álló műszeregyüttes üzemel. A konkrét megoldástól függetlenül, az FT-VCD spektrométerek lényegében azonos elven működnek (4. ábra).



4. Ábra. Egy VCD spektrométer sematikus felépítése.

Az FT-IR spektrométer sugárforrásából származó és a készülék interferométeréből kilépő nem polarizált infravörös nyalábot előbb egy cserélhető optikai szűrőn bocsátjuk keresztül, így az infravörös sugárzást a kívánt spektrumtartományra korlátozzuk. A legjobb jel/zaj viszony ugyanis úgy érhető el, hogy a lehető legszűkebb spektrumtartományra a lehető legnagyobb fényintenzitást biztosítjuk. A nyaláb fényintenzitása az FT-IR spektrométer apertúrájával szabályozható. A nyaláb ezt követően egy polarizációs szűrőn halad át. Ez általában egy tallium-jodid-bromid (KRS-5) hordozóra felvitt, igen finom osztású optikai rácsot képező fémréteg, amely lineáris polarizátorként az infravörös fényt vízszintes síkban polarizálja.

A VCD spektrométer legfontosabb eleme a ZnSe egykristályt tartalmazó fotoelasztikus modulátor (PEM), amelynek főtengelye 45° -os szöget zár be a belépő fény polarizációs síkjával. A ZnSe kristály sajátossága, hogy főtengelye menti vagy arra merőleges irányú mechanikai hatás (nyomás vagy nyújtás) kettőtörésűvé válik, azaz a fő- és melléktengelye mentén eltérő lesz a törésmutatója, az eltérés mértéke a mechanikai hatás erősségétől függ. A PEM-en áthaladó fény terjedési sebessége így különböző lesz e tengelyek által definiált két egymásra merőleges síkban. Mivel a lineárisan polarizált belépő fényhullám felbontható két egymásra merőleges síkban terjedő, azonos fázisú hullámkomponensre, a polarizációs szűrő síkjának és a modulátor tengelyének egymáshoz viszonyított 45° -os elrendezéséből adódóan e két komponens pontosan a ZnSe kristály fő- és melléktengelyének síkjában terjed. A modulátor kristályát érő nyomás szabályozásával elérhető, hogy a két komponens fáziskülönbsége a modulátorból való kilépéskor adott λ hullámhosszra pontosan $\lambda/4$ legyen, aminek eredménye bal- vagy jobbirányú cirkulárisan polarizált fény. A modulátor ZnSe kristályát jól meghatározott modulációs frekvenciával (ez általában 50 vagy 37 kHz) egy piezoelektromos szerkezet periodikusan deformálja, így a modulátort elhagyó infravörös sugárzás váltakozó irányú cirkulárisan polarizált fényként halad át a királis mintán, miközben differenciáltan nyelődik el. Az eredmény a detektorban (mely rendszerint nagyérzékenységű, alacsony zajszintű, cseppfolyós N_2 -nel hűtött MCT detektor)

keletkező olyan elektromos jel, amely a modulációs frekvencián hordozza a királis információt.

A tisztán királis információt hordozó modulált jelet a fotoelasztikus modulátorral (PEM) szinkronizált lock-in erősítő (LIA) segítségével csatoljuk le, ezt különbség- vagy AC jelnek (AC interferogramnak), míg a LIA-t megkerülő globális jelet összeg- vagy DC jelnek (DC interferogramnak) nevezik. Ez utóbbi lényegében az egycsatornás infravörös spektrum Fourier-transzformáltja. E két jel feldolgozásának konkrét megvalósításában az egyes VCD spektrométerek eltérhetnek, így például a BioTools legújabb, ChiralIR-2X spektrométere esetében lock-in erősítőre már nincs is szükség, mivel a jelfeldolgozást egy dedikált áramkör segítségével a vezérlő számítógép végzi. A Bruker PMA37 készüléke egy multiplexert alkalmazva összefésüli a digitalizált AC és DC interferogramot úgy, hogy az adatok váltakozva az AC illetve DC jelhez tartoznak. A multiplex interferogram feldolgozását (az AC és DC interferogramok szétválasztását, apodizációját, fázis-korrekcióját, Fourier-transzformációját, stb.) dedikált szoftver végzi el. Ennek a megoldásnak az előnye, hogy az AC és DC jelet garantáltan azonos körülmények közt (egyidejűleg) mérjük, és egyetlen méréssel megkapjuk mind a VCD, mind pedig az egycsatornás infravörös spektrumot. A nyers VCD spektrum az AC és DC interferogramokból Fourier-transzformációval nyert egycsatornás spektrumok hányadosaként definiálható.

A fotoelasztikus modulátor működési elvéből adódóan a tökéletes cirkulárisan polarizált fény létrejöttéhez szükséges $\lambda/4$ fáziskülönbség csak egyetlen λ hullámhosszú ($\tilde{\nu}$ hullámszámú) fénykomponensre teljesül, ennek értékét a mérendő spektrumtartomány közepére célszerű beállítani. Mivel a modulátor hatékonysága hullámszámfüggő, a nyers VCD spektrum intenzitását egy kalibrációs spektrummal kell korrigálni, amelyet egy kettőtörésű CdS kalibrálókristály és egy második, az analízator szerepét betöltő lineáris polarizátor segítségével nyernek.

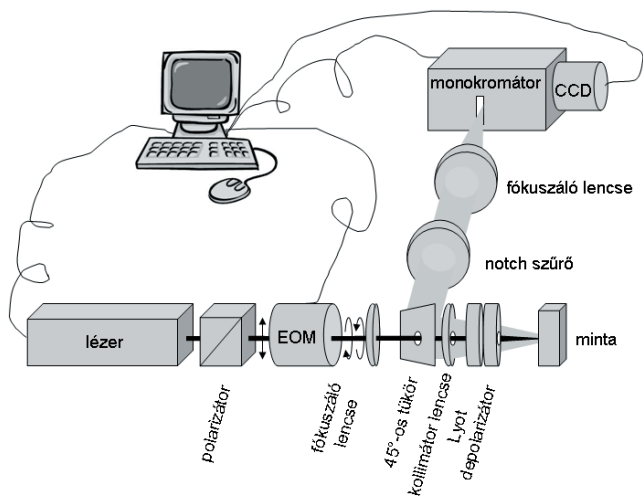
A VCD spektroszkópiai mérések egyik fő problémája az alacsony jel/zaj viszony mellett az alapvonal egyenletlensége és a mérési artifaktumok. Ezek részben az egyes optikai elemek tökéletlenségéből, részben a detektor nemlinearitásából és az infravörös nyaláb polarizációs állapotára való érzékenységéből adódnak. Az alapvonal-problémák jelentős része kiküszöbölhető a BioTools által szabadalmaztatott „dual-PEM” felépítéssel. Ennek lényege, hogy a minta és a detektor közé egy második fotoelasztikus modulátort iktatunk be, és e második modulátorral szinkronizált AC jelet kivonjuk az első (a minta előtti) modulátorral szinkronizált AC jelből. A minta esetleges orientációjából származó (elsősorban szilárd minták esetében jelentkezik) lineáris dikroizmus, valamint a küvettkék anyagának esetleges kettőtöréséből származó artifaktumok egy forgó mintatartó és a „dual-PEM” megoldás együttes használatával lényegesen csökkenthetők.

6.2. Az ICP-ROA készülék

Egy ICP-ROA készülék sematikus rajzát az 5. ábra mutatja. Mint minden mai modern Raman készülékben, a ROA készülékben is a monokromatikus fényt egy lézer szolgáltatja. Ha a kísérletben olyan lézert használnak, amelynek fénye nem, vagy csak kis mértékben polarizált,

akkor a fénynyaláb először egy polarizátoron halad keresztül. A síkban polarizált lézernyaláb ezután egy elektrooptikai modulátorra (EOM) jut. Az EOM a PEM-hez hasonlóan egy olyan kristály, amelyben a két eltérő síkban terjedő fény sebessége eltérő lehet, a két sebesség aránya (azaz a relatív törésmutató) külső hatással változtatható. A PEM-mel szemben ez a külső hatás nem mechanikai összenyomás, hanem elektromos tér. Az EOM-et elhagyó fénynyalábbal, amely időben váltakozik a jobbra és balra cirkulárisan polarizált fény között, sugározzák be a mintát.

Az 5. ábra a leginkább alkalmazott, visszaszórásos (180° -os) elrendezést mutatja be. Először a szórt fény polarizációját egy ún. Lyot-depolarizátorral szüntetik meg. Lencserendszerrel párhuzamosítják a szórt fényt, majd egy tükrök segítségével eltérítik a fénynyalábot. (Mivel a szórt fény optikai tengelye egy irányba esik a beeső lézernyaláb optikai tengelyével az utóbbi három optikai elem, azaz a Lyot-depolarizátoron, a lencserendszeren és a tükrön való keresztülhaladáskor, ezért a jóval kisebb átmérőjű lézernyaláb akadálymentes terjedéséhez kis résekkel látják el e három optikai elem közepét.) Ezután egy olyan optikai szűrő segítségével, amely csak egy szűk tartományban nem engedi át a fényt (ún. notch filter), kiszűrik a szórt fényből a lézer hullámhosszának megfelelő fényt. A fénynyalábot ezután egy monokromátor belépő részére fókuszálják. A monokromátor hullámhossz szerint egy CCD detektorra teríti a fényt. A CCD-ből pedig az EOM frekvenciájának megfelelő sebességgel olvassák ki a jobbra és a balra cirkulárisan polarizált besugárzó lézerfényhez tartozó Raman spektrumokat, majd ezek különbségéből előállítják a ROA spektrumot.

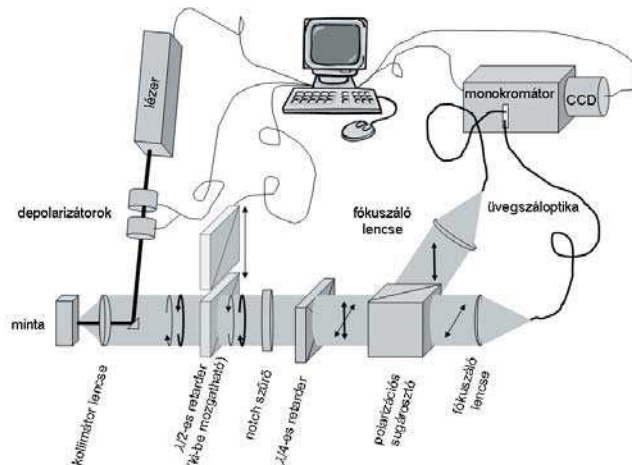


5. Ábra. Egy ICP-ROA spektrométer sematikus felépítése.

6.3. Az SCP-ROA készülék

A jelenleg működő SCP-ROA készülékek, így a BioTools ChiralRAMAN-2X készüléke is, a Werner Hug és csoportja által kifejlesztett SCP-ROA berendezés alapján épültek. Egy ilyen SCP-ROA készülék leegyszerűsített sémáját mutatja be a 6. ábra. Az SP-ROA készülékek esetében először a lézerfény esetleges polarizációjától kell megszabadulni. A ChiralRAMAN-2X készülékekbe frekvenciakétszerezett, 532 nm hullámhosszon lineárisan polarizált fényt kibocsátó Nd:YAG lézert építenek be. A polarizációt úgy szüntetik meg, hogy két kettőtörő kristályt helyeznek a fény útjába,

és ezeket gyorsan és eltérő sebességgel forgatják. Ez időátlagban polarizálatlan fényt eredményez. Egy kis prizma segítségével irányítják ezt a fényt a mintára.



6. Ábra. Egy SCP-ROA spektrométer sematikus felépítése.

A ChiralRAMAN-2X készülék is a visszaszórt fényt gyűjti össze egy gyűjtő és párhuzamosító lencserendszer segítségével. A szórt fényben elvileg a kétféle cirkulárisan polarizált fényt kell vizsgálni. Ez a gyakorlatban úgy történik, hogy a szórt fényt egy notch szűrőn keresztül egy $\lambda/4$ -es kettőtörő folyadékkristályra (quarter-waveplate, $\lambda/4$ -es retarder) vezetik. A $\lambda/4$ -es kettőtörő folyadékkristály a jobbra cirkulárisan polarizált fényből síkban polarizált fényt, a balra cirkulárisan polarizált fényből szintén síkban, mégpedig az előzőre merőleges síkban polarizált fényt állít elő. A két egymásra merőleges síkban polarizált fény ezután egy polarizációs sugárosztóra (Wollaston-prizma) kerül, amely az egyik síkban polarizált fényt tovább engedi, míg az erre merőleges polarizációjú az eredeti optikai tengelyre merőlegesen visszaveri.

A polarizációs sugárosztó után a két fénynyalábot egy-egy lencsével üvegszál-optikára (pontosabban egy-egy több üvegszálból álló üvegszál-optika-kötegre) fókuszálják. Az üvegszál-optika segítségével mindkét fénynyalábot ugyanabba a monokromátorba vezetik be úgy, hogy a monokromátor optikai rácsának alsó felét az egyik, a felső felét a másik fénynyaláb világítja meg. Így a monokromátor úgy vetíti a fényt a CCD detektor síkjára, hogy a pixeleket egyik irányban kétfelé osztja, az egyik felé az egyik, a másik felé pedig a másik (azaz az eredetileg jobbra és az eredetileg balra cirkulárisan polarizált) fénynyalárból érkeznek fotonok. Az erre merőleges irányban a fény hullámhossz szerint bomlik fel. A ROA spektrumot a CCD két félterének különbségként kapjuk.

Mivel ebben az esetben a ROA spektrumot nem időben egymást követő mérések különbségként mérjük, ezért az ilyen elven működő SCP-ROA spektrométer jobb jel/zaj paraméterrel rendelkezik, mint a fentiekben leírt ICP-ROA spektrométer.

A $\lambda/4$ -es kettőtörő folyadékkristályra kapcsolt elektromos feszültség polaritásának megfordításával az általa létrehozott síkban polarizált komponensek 90° -kal elfordulnak, így a CCD kamera két tételére továbbított fénynyalábok is felcserélődnek. A direkt és inverz polaritás mellett felvett

spektrumok különbsége kiküszöböli a CCD kamera két térfelének eltérő érzékenységet, valamint a két fényút eltérő optikai transzmisszióját.

Az alapvonalhibák csökkentése céljából a szórt fény útjába egy ki-be mozgatható $\lambda/2$ -es kettőtörő kristályt (half-waveplate, $\lambda/2$ -es retarder) is be szoktak építeni a notch szűrő elé. A spektrumot úgy is felveszik, hogy ez bent van, illetve úgy is, hogy ez nincs bent a fényútban. A $\lambda/2$ -es retarder a cirkulárisan polarizált fény irányát megfordítja, ezáltal az optika egy ún. „virtuális enantiomer” spektrumot állít elő. Az ilyen módon nyert „virtuális enantiomer” spektrumok egymásból való kivonása a műszer egyes optikai elemeinek nemkívánatos cirkuláris és lineáris polarizációt okozó hibáiból adódó alapvonal-egyenetlenségek és artifaktumok kiküszöbölését teszi lehetővé.

Átalakítással, cirkulárisan (vagy lineárisan) polarizált fényvel besugározva az SCP-ROA készülékekkel DCP- (vagy LCP-SCP-) ROA spektrumot is fel lehet venni. Hangolható lézer segítségével pedig rezonancia-SCP-ROA kísérleteket is vezettek már.

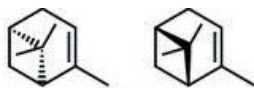
Mivel a ROA intenzitás nagyon kicsi, ezért a ROA készülékek, így a kereskedelemben kapható ChiralRAMAN-2X készülék felbontása sem nagy, kb. 8–10 cm^{-1} . Cserébe viszont a ChiralRAMAN-2X ROA spektrométer egyben a kereskedelemben kapható egyik legérzékenyebb Raman spektrométer is.

7. Példák a VOA módszerek alkalmazására

Az alábbiakban néhány kiragadott példát mutatunk be a módszer alkalmazására, és a számított spektrumok megbízhatóságára. További példák találhatóak az [5,22,23,43–47] referenciákban.

7.1. Kis és közepes méretű merev molekulák

Kismolekulák VOA módszerekkel történő abszolút konfiguráció meghatározását az α -pinén (7. ábra) példáján mutatjuk be. A 8. és a 9. ábrán a hígítatlan R (+)- α -pinén és S (-)- α -pinén mért, valamint az R (+)- α -pinén B3LYP/ aug-cc-pVTZ számított VCD és (SCP)-ROA spektrumát mutatjuk. (A számításokat természetesen elég csak az egyik enantiomerre elvégezni, hiszen az enantiomerek esetében a rezgési frekvenciák és intenzitások megegyeznek, csak a sávok előjelet váltanak.) Jól látszik, hogy a két enantiomer mért spektruma szinte tökéletes tükörképe egymásnak, azaz sem a VCD sem a ROA spektrumban nem jelennek meg mérési artifaktumok.

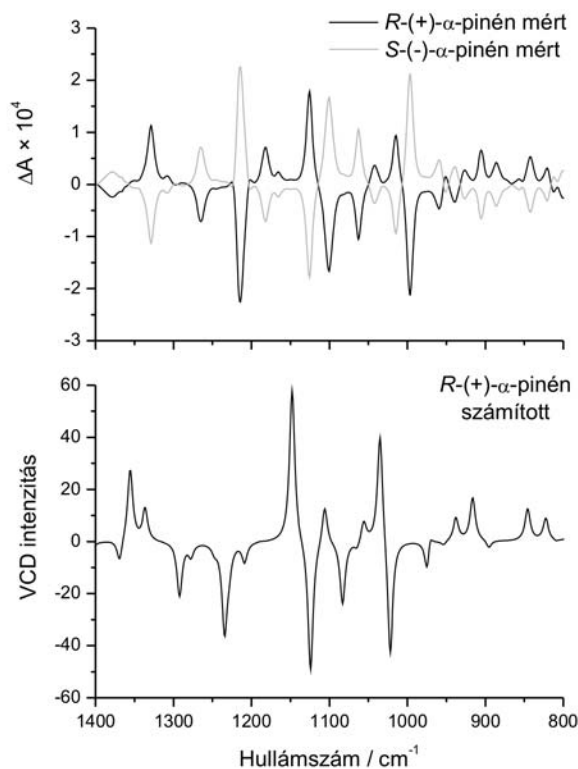


7. Ábra. Az R (+)- α -pinén és a S (-)- α -pinén.

A számításokat és a méréseket összevetve ránézésre is jól látható, hogy az intenzívebb sávok mért és számított előjele, valamint relatív intenzitása kiváló egyezést mutat mind a VCD, mind a ROA spektrumok esetében. (Az elméleti spektrumok esetében skálázást nem alkalmaztunk, így a legtöbb számított hullámhosszérték kissé nagyobb

értéknél látható, mint a mért spektrum esetében. Az egyezés skálázással javítható.) A kiváló egyezés teljesen egyértelmű abszolút konfiguráció meghatározását tesz lehetővé, amit nem befolyásol az, hogy a tucatnyi jó egyezést mutató nagy és közepes intenzitású sáv mellett egy-egy kis intenzitású (pl. a VCD spektrumban 900 cm^{-1} körül) sáv számított és mért előjele nem egyezik. A VCD spektrumok esetében a számítások is megmutatják, hogy ezek az utóbbi sávok nem robosztus sávok (lásd 4.1 fejezet), előjelük bizonytalan, a kiértékelésnél ezeket nem kell figyelembe venni.

A bemutatott VCD és ROA spektrumok esetében ki kell emelni, hogy a spektrumok felvételéhez egy, illetve fél órányi mérési időt alkalmaztunk. A mérések előkészítése néhány percet vesz igénybe, a kiértékelésekhez elengedhetetlen számítások pedig egy nem nagy teljesítményű személyi számítógépen is néhány óra alatt lefutnak. Összességében megállapítható, hogy egy ekkora merev, gyenge intermolekuláris kölcsönhatásokat kialakító molekula abszolút konfiguráció meghatározása kis gyakorlattal már pár óra alatt elvégezhető. Ahogy azt a következő fejezetben tárgyaljuk, az intermolekuláris kölcsönhatásokat oldószermodellel, a molekulák flexibilitását pedig konformációanalízissel vehetjük figyelembe. Ilyenkor az analízis valamivel több gyakorlatot igényel, a spektrum kiértékelése ilyenkor is elvégezhető néhány nap alatt.

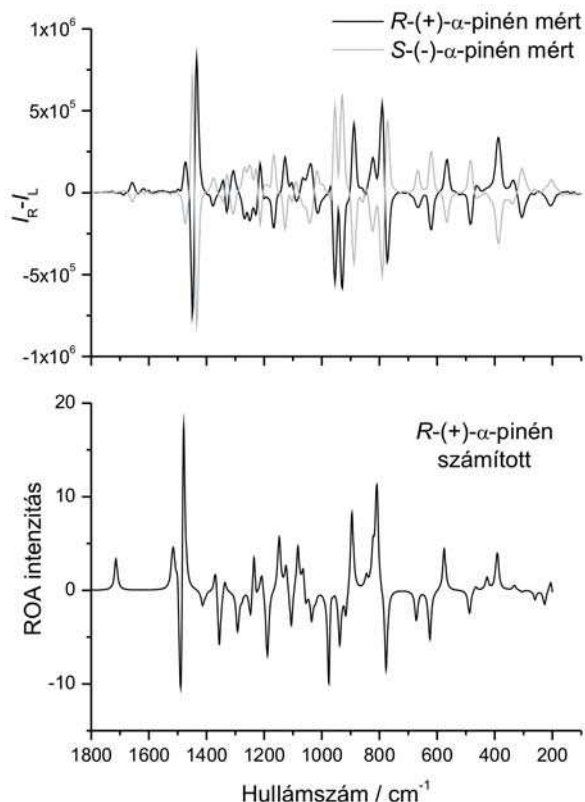


8. Ábra. Az R (+)- α -pinén és az S (-)- α -pinén mért (1 óra mérési idő, 4 cm^{-1} -es felbontás, hígítatlan minta, 50 μm -es BaF_2 küvetta) és az R (+)- α -pinén számított (B3LYP/aug-cc-pVTZ, oldószermodell nélkül) VCD spektruma. A spektrumok az ELTE Equinox 55 FTIR + VCD PMA 37 készüléken lettek felvéve.

7.2. Kis és közepes méretű flexibilis molekulák

Mivel a VCD és a ROA spektrum nemcsak az abszolút konfigurációtól, hanem a konformációtól is függ, flexibilis molekulák esetén az elméleti spektrum számítása mellett

konformációanalízist kell végezni, azaz meg kell becsülni az egymással dinamikus egyensúlyban levő konformerek populációját. Ehhez rendszerint Boltzmann-eloszlást tételezünk fel, és egy adott T hőmérsékleten az i -edik konformer relatív populációját a (22) képlettel számítjuk ki, ahol ΔG_i° az adott konformernek a legkisebb energiájú konformerhez viszonyított szabadentalpia-különbsége.

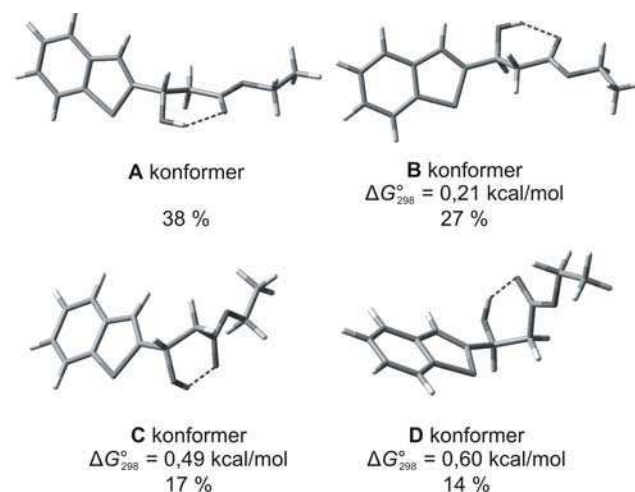


9. Ábra. Az R -(+)- α -pinén és az S -(-)- α -pinén mért (0,5 óra mérési idő, kb. 8–10 cm^{-1} -es felbontás, 80 mW lézerteljesítmény, 532 nm lézershullámhossz, hígítatlan minta, kvarcküvetta) és az R -(+)- α -pinén számított (B3LYP/aug-cc-pVTZ, oldószermodell nélkül) SCP-ROA spektruma. A spektrumok az ELTE ChiralRAMAN-2X készülékén lettek felvéve.

$$p_i = e^{-\frac{\Delta G_i^\circ}{RT}} / \sum_i e^{-\frac{\Delta G_i^\circ}{RT}} \quad (22)$$

Mivel a spektrumhoz minden konformer hozzájárul a saját populációjának mértékében, a flexibilis molekula elméleti spektruma ($S(v)$) legjobban az egyes konformerek számított spektrumának ($S_i(v)$) populációval súlyozott összegeként írható le, azaz $S(v) = \sum_i p_i S_i(v)$. Flexibilis molekulák esetén tehát a kísérleti és elméleti spektrum közti jó egyezést a populációk becslésének pontossága is befolyásolja. Mivel a mérések gyakran oldatfázisban történnek, és az oldószer akár jelentősen befolyásolhatja a konformerelegy összetételét, célszerű mind a konformációanalízis, mind a spektrumok számítása során valamilyen oldószermodellt alkalmazni. Különösen fontos az oldószermodell használata akkor, ha a vizsgált molekula és az oldószer között számottevő szolvatáció jöhet létre. Leggyakrabban polarizált kontinuum oldószermodelleket alkalmaznak,^{48,49} de H-kötést kialakító oldószer (pl. víz) esetében gyakran csak explicit oldószermolekulákkal (azaz a vizsgált molekula és az oldószer komplexére) történő számítás ad megfelelő eredményt.

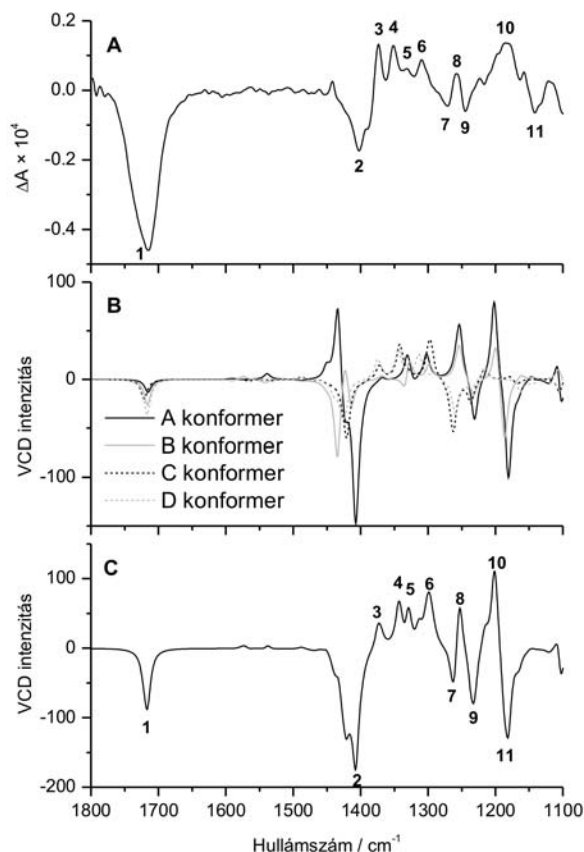
Flexibilis molekula VCD spektroszkópián alapuló abszolút konfiguráció meghatározását szemléltethetjük az általunk vizsgált, (S)-(-)-3-benzo[b]tiofen-2-il-3-hidroxi-propánsav-etilészter esetével.⁵⁰ A balra forgató enantiomert a racém vegyület enantioszelektív enzimatis acilezése során nyerték (az enzim csak az egyik enantiomer HO-csoportjának acilezését katalizálja). A vegyület igen flexibilis, nincs kitüntetett domináns konformere. Az S enantiomer vákuumban, B3LYP/6-31G* szinten végzett konformációanalízis szerint négy legalacsonyabb energiájú konformerének (10. ábra) összesített populációja mintegy 96%, így lényegében ezek járulnak hozzá a VCD spektrumhoz. A CDCl_3 -oldatban mért VCD spektrum (11. A ábra) nem írható le jól egyetlen egyedi konformer számított VCD spektrumával sem (11. B ábra), azonban a populációval súlyozott összegspektrum (11. C ábra) igen jó egyezést ad a mért spektrummal, annak ellenére, hogy a számítás során nem alkalmaztunk oldószermodellt (a kloroform szolvatációs hatása elhanyagolható volt). Az eredmény alapján teljes biztonsággal megállapítható, hogy a balra forgató enantiomer abszolút konfigurációja S .



10. Ábra. Az (S)-(-)-3-benzo[b]tiofen-2-il-3-hidroxi-propánsav-etilészter négy legkisebb energiájú konformerének B3LYP/6-31G* szinten számított szerkezete, relatív szabadentalpiája és populációja.

7.3. Fémkomplexek

A VCD spektroszkópiát több esetben sikeresen alkalmazták királis fémkomplexek abszolút konfigurációjának és konformációjának meghatározására. Ezek között olyan vegyületek is előfordultak, ahol a ligandumok ugyan akirálisak, de a központi fématom körül kelátos koordinációval királis elrendeződésű komplexet alkotnak. Ilyen például a Sato és munkatársai⁵¹ által vizsgált $[M(\text{III})(\text{acac})_3]$ (acac = acetilacetato; $M = \text{Cr}, \text{Co}, \text{Ru}, \text{Rh}, \text{Ir}, \text{Al}$) vagy $[M(\text{III})(\text{acac})_2(\text{dbm})]$ (dbm = dibenzoilmetano; $M = \text{Cr}, \text{Co}, \text{Ru}$). E komplexek Δ és Λ enantiomerjeit egyértelműen azonosítani lehet mért és számított spektrumok összehasonlítása alapján. A szintén akirális ligandumot tartalmazó, de királis elrendeződésű (+)-*tris*(etiléndiamin)k obalt(III) komplex részletes konformációvizsgálatát és VCD spektrumának értelmezését Nafie és munkatársai közölték.⁵² $\text{Rh}_2(\text{II})$ -tetraacetáttól és aminosavszármazékokból ligandumcserével előállított kétmárvú $\text{Rh}(\text{II})$ komplexek VCD spektroszkópiái vizsgálatával az ELTE Kiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratóriuma foglalkozik.⁵³



11. Ábra. Az (S)-(-)-3-benzo[b]tiofen-2-il-3-hidroxi-propánsav-etilészter CDCl_3 -ban mért VCD spektruma (A), az S enantiomer A-D konformerének B3LYP/6-31G* elméleti szinten számított, populációval súlyozott VCD spektruma (B), valamint a konformerek számított spektrumának populációval súlyozott összesspektruma (C).

Királis fémkomplexek ROA spektroszkópián alapuló vizsgálatában nehézséget okozhatja a molekula fluoreszcenciája vagy abszorpciója a látható tartományban. Az abszorpció elsősorban a színes átmenetifém-komplexeknél problémás, ugyanis nehéz nemrezonáns mérési körülményeket teremteni, vagy az oldat erős fényelnyelése miatt a Raman és ROA spektrum intenzitása igen csekély lesz. Átmenetifém-komplexe ROA spektroszkópiájára is találunk példát az irodalomban. Elsőként egy királis Zr(IV)-komplex, a dikloro[etilénbis(4,5,6,7-tetrahidro-1-indenil)]cirkónium(IV) enantiomerjeinek abszolút konfigurációját sikerült nemrezonáns körülmények közt mért és számított ROA spektrumának összehasonlítása alapján meghatározni.⁵⁴

7.4. Peptidek és szénhidrátok térszerkezet-vizsgálata

Peptidek és fehérjék esetében az építőkövek (aminosav-egységek) abszolút konfigurációja legtöbbször ismert, így a vizsgálat tárgya nem ez, hanem ezek egymáshoz viszonyított térbeli elrendeződése, a konformációk és konformációs eloszlás meghatározása. VCD és ROA spektroszkópia segítségével információt kaphatunk a peptidlánc konformációját jellemző másodlagos szerkezeti elemekről (α -hélix, 3_{10} -hélix, β -redő, poliprolin II konformáció, rendezetlen szerkezet, különféle kanyarok). A peptidek és fehérjék legjellemzőbb, legintenzívebb rezgése az IR és VCD spektrumban az 1600–1700 cm^{-1} tartományban jelentkező amid I mód (D_2O -ban végzett mérések esetén

az amidcsoportok deuterálása miatt mintegy 5–10 cm^{-1} értékkel alacsonyabb frekvencián jelentkeznek, ezért amid I'-ként jelölik), ami kb. 80%-ban C=O vegyértékrezgésből áll. Szintén hasznos lehet az 1500–1600 cm^{-1} között jelentkező amid II rezgési mód, amely főleg N–H síkban hajlító rezgés, kevés C–N nyújtással kombinálva (ez D_2O -ban 1450 cm^{-1} környékére tolódik el és amid II'-nek nevezzük). A ROA-spektrumban az amid I-II sávok intenzitása kicsi, sokkal informatívabb az ún. kiterjesztett amid III tartomány (1230–1350 cm^{-1}), amely elsősorban azonos fázisban csatolt C–N nyújtási és N–H síkban deformációs rezgésből származik, valamennyi C_α -H deformációval kombinálva.

Az amid I-III sávok mintázata függ az aminosav-egységek lokális konformációjától, a szomszédos amidcsoportok rezgéseinek csatolásától és a különböző H-kötéses sémákból eredő sáveltolódásoktól, mindez megmagyarázza a VCD és ROA érzékenységet a peptidek és fehérjék másodlagos szerkezetére. Fehérjék VCD spektroszkópiai vizsgálata során többnyire vizet vagy D_2O -t (esetleg vizes vagy nehézvízes puffereket) használnak oldószerként, az oldószer intenzív abszorpciója miatt azonban kis rétegvastagságot és nagy koncentrációt kell alkalmazni, az elérhető spektrumtartomány is eléggé behatárolt. Kisebb peptidek spektrumának felvételéhez szerves (elsősorban deuterált) oldószer is használható. A ROA spektroszkópiában a víz a legjobb oldószer (a szerves oldószer csak korlátozottan alkalmazható), így a peptidek és fehérjék natív közegben történő vizsgálatára ideális.

Természetesen fehérjék esetében nincs mód a spektrumok pontos elméleti számítására a molekula nagy mérete miatt. A fehérjék VCD és ROA spektrumának értékelése elsősorban empirikus módon történik, így globális információt nyerhetünk a másodlagos szerkezeti elemek előfordulásáról és esetleg arányáról. Erről részletesen olvashatunk egy frissen megjelent kiroptikai spektroszkópiai kézikönyv megfelelő fejezeteiben.^{55,56} Kisebb peptidek esetében lehetőség van a spektrumok számítására, a térszerkezet konformációanalízissel és kvantumkémiai számításokkal igazolható. Ebben az esetben a flexibilis molekuláknál alkalmazott, korábban tárgyalt módszerrel analóg módon járunk el. Hangsúlyoznunk kell, hogy peptidek és más biomolekulák esetében az oldószerhatás rendszerint nem hanyagolható el, tehát mindenképpen használnunk kell valamilyen oldószermodellt a számítások során.

Empirikusan megfigyelték, majd számításokkal is igazolták, hogy a szénhidrátok glikozidos OH-csoportjának térállásáról a VCD spektrumok 1145 cm^{-1} környékén megjelenő sávja ad információt.⁵⁷ Szénhidrátok vizsgálatára azonban a ROA spektroszkópia sokkal alkalmasabb, mivel a szénhidrátok többsége kiválóan oldódik vízben, és így a műszer teljes méréstartományában felvehető a spektrumuk. Mivel a ROA spektrum érzékeny a cukrok szomszédos OH-csoportjainak relatív térállására (a C–O rezgések erős csatolása miatt), a piranóz- vagy furanózgyűrű konformációjára és glikozidos kötés (α vagy β) konfigurációjára, gyakorlatilag ujjlenyomatként jellemez egy szénhidrát molekulát.⁵⁸ Mivel víz erősen szolvatálja a cukrokat, H-kötéseket alakítva ki az OH-csoportokkal, a számított spektrumok még polarizált kontinuum oldószermodellek esetén sem adnak jó egyezést a kísérleti ROA spektrumokkal, a szénhidrátok spektrumának

megbízható számolásához tehát elengedhetetlen a vízmolekulák explicit figyelembe vétele.⁵⁹

7.5. Szupramolekuláris szerveződésektől biológiai alkalmazásokig

A VOA technikákat egyre elterjedtebben használják szupramolekuláris szerveződések vizsgálatára is. VCD (és ECD) spektroszkópia segítségével például megmutatták, hogy tartarát jelenlétében akirális amfifilek önszerveződése során királis micellák jönnek létre.⁶⁰ Egy közelmúltbeli VCD vizsgálat során megfigyelték, hogy egy azobenzol-tartalmú folyadékkristálynak megváltoztatható a szupramolekuláris kiralitása,⁶¹ ha cirkulárisan polarizált fényel sugározzák be. Szintén a közelmúltban állapították meg azt is, hogy a VCD spektroszkópia igen érzékeny az amiloidszálak hosszabb távú, szupramolekuláris kiralitására.⁶²

Mind VCD,⁶³ mind ROA^{64,65} technikákkal vizsgáltak vírusokat. Mindkét módszer elsődlegesen a vírus RNS-ét borító fehérjék szerveződésére ad információt. Ilyen jellegű információt korábban csak röntgen-diffrakcióval lehetett nyerni. A röntgen-diffrakciós vizsgálat azonban jóval nehezebb, mivel először a vírusokat ki kell kristályosítani. A ROA vizsgálatok ezen is túlmutató, fontosabb információval szolgáltak. A vírus ROA spektrumának és az RNS-t nem tartalmazó üres fehérjetokról felvett ROA spektrum kivonásával meg lehetett különböztetni eltérő RNS-szálakat tartalmazó vírusokat. Ilyen információt a röntgen-diffrakciós adatokból nem lehet kinyerni.

8. Kutatási témák az ELTE-n

Az ELTE Kiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratóriumában a VCD spektroszkópiát királis molekulák abszolút konfigurációjának meghatározásra és konformációs viszonyainak felderítésére egyaránt alkalmaztuk. A Szegedi Tudományegyetemmel együttműködve számos, lipoláz jelenlétében enzimatisz szintézissel nyert enantiomertiszta ciklusos β -laktám abszolút konfigurációját vizsgáltuk.⁶⁶ Egyértelműen igazolható volt, hogy az enzim jelenlétében mindig ugyanolyan abszolút konfigurációjú termék keletkezett, függetlenül a kondenzált gyűrű méretétől, annak telített, telítetlen vagy aromás jellegétől. A Kolozsvári Babeş-Bolyai Egyetemmel közösen végzett kutatásaink során szintén enzimatisz sztereoselektív szintézissel előállított királis 3-heteroaril-3-hidroxi-propionsav-etilészterek,^{50,67} 3-heteroaril-3-acetoxi-propionitrilek⁶⁸ és 3-klór-1-arilpropán-1-olok⁶⁹ abszolút konfigurációját határoztuk meg.

A peptidek, peptidmimetikumok és királis átmenetifémkomplexek térszerkezetének vizsgálata terén végzett kutatásainkat e folyóirat egy korábbi számában² részletesebben összefoglaltuk. A peptidek területén kutatásaink többek közt kanyarszerkezetek spektroszkópiai jellemzésére szintetizált ciklotetrapeptidek,^{70,71} *transz*-(1*S*,2*S*)-2-aminociklopentán-karbonsav (*transz*-Acpc) vagy *transz*-(1*S*,2*S*)-2-aminociklohexán-karbonsav (*transz*-Ache) egységeket tartalmazó ciklopenta- és hexapeptidek,⁷² valamint tisztán β -aminosavakat tartalmazó, alternáló kiralitású *cisz*-2-amino-ciklopentánkarbonsav (*cisz*-Acpc) egységekből felépített H-[(1*S*,2*R*)-*cisz*-Acpc-(1*R*,2*S*)-*cisz*-Acpc]_n-NH₂ (*n*=2, 3) heterokirális

oligomerek,⁷³ továbbá természetes és mutáns efrapeptinek⁷⁴ konformációjának VCD spektroszkópiái vizsgálatára terjedtek ki. Egyik legaktuálisabb kutatási terület a védett aminosavegységeket tartalmazó királis kétmagvú Rh(II)-komplexek szintézise, izolálása,⁷⁵ és szerkezetének VCD spektroszkópiával történő felderítése.⁵³ Jelenleg olyan új típusú, két aminosavligandumot tartalmazó, eredendően királis Rh₂(II) komplexek szintézise és kiroptikai vizsgálata van folyamatban, melyek VCD spektrumában erős rezgési excitoncsatolás figyelhető meg, lehetővé téve a királis komplexek abszolút konfigurációjának meghatározását célzó egyszerű empirikus kiroptikai szabály megfogalmazását.

A ROA-spektroszkópia közelmúltban való bevezetése elindította a biomolekulák (peptidek, szénhidrátok), valamint ezek építőköveinek vizes közegben való térszerkezetvizsgálatát, az első eredményt, az Ac- β -homoPro-NHMe ROA spektrumának értelmezését nemrég publikáltuk.² A közeljövőben diszulfid-hidas és triptofán-egységet tartalmazó ciklopeptidek, valamint cukoraminosavakból felépülő foldamerek térszerkezetének ROA spektroszkópiái jellemzését is tervezzük.

Az ELTE Molekulaspektroszkópiái és Kiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratóriumainak együttműködésében elsők között végeztünk mátrixizolációs VCD (MI-VCD) méréseket. Vizsgálataink előtt ugyan már megmutatták,^{76,77} hogy a két technika kombinálása technikailag kivitelezhető, de nem világítottak rá a MI-VCD mérések fő előnyeire, így sokáig nem alkalmazták ezt a módszert. Megmutattuk, hogy a kriogén nemesgázmátrixokban mért VCD spektrumok az oldószerben vagy a hígítatlan mintáról felvett spektrumokhoz viszonyított sokkal jobb felbontása lehetővé teszi olyan bonyolult, flexibilis, sok konformerrel rendelkező molekulák VCD vizsgálatát is, amikor a konformerek egymáshoz közel eső, ellentétes előjelű sávjai gyakorlatilag kioltják egymást.⁷⁸ Szintén előnyt jelent az is, hogy nem kell figyelembe venni az oldószerhatást, így a spektrumértelmezéshez szükséges számítások is leegyszerűsödnek. A MI-VCD technikát modellpeptid térszerkezetének vizsgálatán kívül^{79,80} az ún. kiralitás transzfer megfigyelésére is használtuk.^{37,81} Kiralitás transzfer (vagy indukált kiralitás) alatt értjük azt a jelenséget, amikor a vizsgált királis molekula és egy akirális molekula (pl. oldószer) között kialakult intermolekuláris kölcsönhatások miatt az akirális molekula is optikailag aktívvá válik, (rezgési) átmenetei is megjelennek a (V)CD spektrumban.^{44,82,83} A jelenség nemcsak alapkutatói szempontból és a kialakuló komplexek térszerkezetének felderítéséhez nyújtott értékes információ miatt jelentős, hanem gyakorlati szempontból is fontos annak megértése, hogy az ilyen kölcsönhatások mikor és milyen mértékben nehezítik meg az egyszerű oldószeres VCD vizsgálatok kiértékelését. Hasonló, gyakorlati szempontból is fontos eredményre vezető vizsgálataink például megmutatták, hogy bár a karbonsav dimerek VCD spektrumának számítása időigényesebb, oldószeres méréseknél mégis érdemes ezeket a molekulákat olyan koncentrációtartományban mérni, ahol döntő részt dimerek vannak jelen; a karbonsav dimerek VCD jelei ugyanis intenzívebbek és robosztusabbak, mint a monomerek VCD sávjai.³⁷ A MI-VCD technika alkalmas lehet királis reakcióintermedierek, reaktív molekulák és gyökök VCD vizsgálatára is. Vizsgálataink által inspirálva ma már más kutatócsoportok is alkalmazzák a MI-VCD

technikát.⁸⁴ A közeljövőben szeretnénk próbálkozni a MI és a ROA módszer kombinálásával is.

Aktívan foglalkozunk VCD és ROA spektrumok számítására alkalmas programkódok fejlesztésével is. A VCD számítások PQS programcsomagba való beépítése Pulay Péterrel való együttműködés keretében valósult meg. A 4.1. fejezetben már említettük, hogy a szerzők egy része alternatív megbízhatósági faktorokat javasolt, amelyek szintén be lettek építve a PQS programcsomagba.³⁶ A közelmúltban az ELTE Elméleti Kémiai Laboratóriumával együttműködésben a VCD számítások pontos, CC (coupled cluster) szintű beprogramozását kezdtük el.

9. Összefoglalás helyett

Reméljük, hogy mind ez a közlemény, valamint későbbi személyes tapasztalatszerzések, együttműködések is hozzájárulhatnak ahhoz, hogy ezek módszerek ne csak egyetemünkön, hanem hazánkban is minél előbb elnyerjék méltó szerepüket az alap- és alkalmazott kutatásokban is.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönettel tartoznak Hollósi Miklósnak, Surján Péternek, valamint Keszei Ernőnek a VCD és a ROA technikák meghonosításában betöltött kulcsszerepükért. A ROA készülék beszerzése a KMOP-4.2.1/B-10-2011-000 pályázat keretében történt, a szerzők kutatómunkáját az OTKA K75877, K81175 és a TAMOP 4.2.1./B-09/KMR-2010-0003 pályázatok is támogatják.

Hivatkozások

1. <http://www.chiralitycentre.eu/>.
2. Hollósi, M.; Knapp, K.; Majer, Zs.; Szilvágyi, G.; Vass, E.; *Magyar Kémiai Folyóirat*, **2012**, 118, 145.
3. Hollósi, M.; Majer, Zs.; Vass, E.; *Magyar Kémiai Folyóirat*, **2006**, 112, 117–122.
4. Bazsó, G.; Magyarfalvi, G.; Tarczay, G. *Magyar Kémiai Folyóirat*, **2006**, 112, 137–148.
5. Nafie, L. A. *Vibrational Optical Activity: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, **2011**.
6. Barron, L. D. *Molecular Light Scattering and Optical Activity*, Cambridge University Press, **2004**.
7. Arago, J. D. F. *Mém. Inst.* **1811**, 1, 93–134.
8. Kahr, B.; Arteaga, O. *ChemPhysChem* **2012**, 13, 79–88.
9. Biot, J.-B. *Mém. Inst.* **1812**, 13, 1–371.
10. Biot, J.-B. *Bull. Soc. Philomat.* **1815**, 190–192.
11. Biot, J.-B. *Mém. Acad. Sci.* **1817**, 2, 41–136.
12. Arago, F.; Fresnel, A. *Ann. Chim. et Phys.* **1819**, 10, 288–305.
13. Haidinger, W. *Ann. Phys.* **1847**, 70, 531–544.
14. Cotton, A. *Compt. Rend.* **1895**, 120, 989–991.
15. Katzin, L. I. *J. Phys. Chem.* **1964**, 68, 2367–2370.
16. Barron, L. D.; Buckingham, A. D. *Mol. Phys.* **1971**, 20, 1111–1119.
17. Holtzwarth, G.; Chabay, I. *J. Chem. Phys.* **1972**, 57, 1632–1635.
18. Barron, L. D.; Bogaard, M. P.; Buckingham, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 603–605.
19. Hug, W.; Kint, S.; Bailey, G. F.; Scherer, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 5589–5590.
20. Holtzwarth, G.; Hsu, E. C.; Mosher, H. S.; Faulkner, T. R.; Moscowitz, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 251–252.
21. Nafie, L. A.; Cheng, J. C.; Stephens, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 3842–3843.
22. Magyarfalvi, G.; Tarczay, G.; Vass, E. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2011**, 1, 403–425.
23. Barron, L. D.; Buckingham, A. D. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, 492, 199–213.
24. Rosenfeld, L. *Z. Physik* **1929**, 52, 161–174.
25. Stephens, P. J. *J. Phys. Chem.* **1985**, 89, 748–752.
26. Cheeseman, J. R.; Frisch, M. J.; Devlin, F. J.; Stephens, P. J. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, 252, 211–220.
27. Gaussian 09, Revision A.1, Frisch, M. J. et al. Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**, <http://gaussian.com/>.
28. DALTON, a molecular electronic structure program, Release Dalton2011 (2011), see <http://daltonprogram.org/>.
29. ADF2012, SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands, <http://www.scm.com>.
30. Nicu, V. P.; Neugebauer, J.; Wolff, S. K.; Baerends, E. J. *Theo. Chem. Acc.* **2008**, 119, 245–263.
31. <http://pqs-chem.com/>
32. Baker, J.; Wolinski, K.; Malagoli, M.; Kinghorn, D.; Wolinski, P.; Magyarfalvi, G.; Saebø, S.; Janowski, T.; Pulay, P. *J. Comp. Chem.* **2009**, 30, 317–335.
33. Baker, J.; Janowski, T.; Wolinski, K.; Pulay, P. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, 2, 63–72.
34. Cappelli, C.; Bloino, J.; Lipparini, F.; Barone, V. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, 3, 1766–1773.
35. Nicu, V. P.; Baerends, E. J. *J. Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 6107–6118.
36. Göbi, S.; Magyarfalvi, G. *J. Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 16130–16133.
37. Göbi, S.; Vass, E.; Magyarfalvi, G.; Tarczay, G. *J. Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 13972–13984.
38. Ruud, K.; Helgaker, T.; Bour, P. *J. Phys. Chem. A* **2002**, 106, 7448–7455.
39. Helgaker, T.; Ruud, K.; Bak, K. L.; Jørgensen, P.; Olsen, J. *Faraday Discuss.* **1994**, 99, 165–180.
40. <http://www.psicode.org/>.
41. Crawford, T. D.; Ruud, K. *ChemPhysChem* **2011**, 12, 3442–3448.
42. Jensen, L.; Autschbach, J.; Krykunov, M.; Schatz, G. C. *J. Chem. Phys.* **2007**, 127, 134101–1–11.
43. Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Cheeseman, J. R. *VCD Spectroscopy for Organic Chemists*, CRC Press, **2012**.
44. Yang, G.; Xu, Y. *Top. Curr. Chem.* **2011**, 298, 189–236.
45. Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Pan, J. J. *Chirality* **2008**, 20, 643–63.
46. He, Y.; Wang, B.; Dukor, R. *Appl. Spectrosc.* **2011**, 65, 699–723.
47. Stephens, P. J.; Pan, J. J.; Krohn, K. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 7641–7649.
48. Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **2002**, 117, 43–54.
49. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2999–3094.
50. Brem, J.; Paizs, C.; Toşa, M. I.; Vass, E.; Irimie, F. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 489–496.
51. Sato, H.; Taniguchi, T.; Nakahashi, A.; Monde, K.; Yamagishi, A. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 6755–6766.
52. Freedman, T. B.; Cao, X.; Young, D. A.; Nafie, L. A. *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 3560–3565.
53. Szilvágyi, G.; Majer, Z.; Vass, E.; Hollósi, M. *Chirality* **2011**, 23, 294–299.
54. Johannessen, C.; Hecht, L.; Merten, C. *ChemPhysChem* **2011**, 12, 1419–1421.
55. Keidreling, T. A.; Lakhani, A. In *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy*; Berova, N.; Polavarapu, P. L.; Nakanishi, K.; Woody, R. W., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, **2012**; Vol. 2, pp 707–758.
56. Barron, L. D.; Hecht, L. In *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy*; Berova, N.; Polavarapu, P. L.; Nakanishi, K.;

- Woody, R.W., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, **2012**; Vol. 2, pp 759–793.
57. Taniguchi, T., Monde, K. *Chem-Asian J* **2007**, *2*, 1258–1266.
 58. Wen, Z.Q.; Barron, L.D.; Hecht, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 285–292.
 59. Cheeseman, J.R.; Shaik, M.S.; Popelier, P.L.; Blanch, E.W. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4991–4997.
 60. Brizard, A.; Berthier, D.; Aimé, C.; Buffeteau, T.; Cavagnat, D.; Ducasse, L.; Huc, I.; Oda, R. *Chirality* **2009**, *21*, E153–62.
 61. Moreno, J. R. A.; González, J. J. L.; Ureña, F. P.; Vera, F.; Ros, M. B.; Sierra, T. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 5090–5096.
 62. Ma, S.; Cao, X.; Mak, M.; Sadik, A.; Walkner, C.; Freedman, T. B.; Lednev, I.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12364–12365.
 63. Shanmugam, G.; Polavarapu, P. L.; Kendall, A.; Stubbs, G. *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 2371–2377.
 64. Blanch, E. W.; Robinson, D. J.; Hecht, L.; Barron, L. D. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 1499–1502.
 65. Blanch, E. W.; Hecht, L.; Syme, C. D.; Volpetti, V.; Lomonosoff, G. P.; Nielsen, K.; Barron, L. D. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 2593–2600.
 66. Vass, E.; Hollósi, M.; Forró, E.; Fülöp, F. *Chirality* **2006**, *18*, 733–740.
 67. Brem, J.; Toşa, M.I.; Paizs, C.; Vass, E.; Irimie, F.D. *Tetrahedron:Asymmetry* **2010**, *21*, 365–373.
 68. Bencze, L.C.; Paizs, C.; Toşa, M.I.; Vass, E.; Irimie, F.D. *Tetrahedron:Asymmetry* **2010**, *21*, 443–450.
 69. Pop, L.A.; Czompa, A.; Paizs, C.; Toşa, M.I.; Vass, E.; Mátyus, P.; Irimie, F.D. *Synthesis* **2011**, 2921–2928.
 70. Vass, E.; Majer, Zs.; Kóhalmy, K.; Hollósi, M. *Chirality* **2010**, *22*, 762–771.
 71. Vass, E.; Kóhalmy, K.; Majer, Zs.; Hollósi, M. *In Peptides 2004*; Flegel, M.; Fridkin, M.; Gilon, Ch.; Slaninova, J. Eds.; Kenes International: Geneva, **2005**, pp 1037–1038.
 72. Vass, E.; Strijowski, U.; Wollschläger, K.; Mándity, I. M.; Szilvágyi, G.; Jewgiński, M.; Gaus, K.; Royo, S.; Majer, Zs.; Sewald, M.; Hollósi, M. *J. Peptide Sci.* **2010**, *16*, 613–620.
 73. Martinek, T.A.; Mándity, I.M.; Fülöp, L.; Tóth, G.K.; Vass, E.; Hollósi, M.; Forró, E.; Fülöp, F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13539–13544.
 74. Weigelt, S.; Huber, T.; Hofmann, F.; Jost, M.; Ritzefeld, M.; Luy, B.; Freudenberger, C.; Majer, Z. ; Vass, E.; Greie, J.-C.; Panella, L.; Kaptein, B.; Broxterman, Q.B.; Kessler, H.; Altendorf, K.; Hollósi, M.; Sewald, N. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 478–487.
 75. Szilvágyi, G.; Hollósi, M.; Tölgyesi, L.; Frelek, J.; Majer, Zs. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2594–2599.
 76. Schlosser, D.; Devlin, F.; Jalkanen, K.; Stephens, P.; *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *88*, 286–291.
 77. Henderson, D. O.; Polavarapu, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7110–7111.
 78. Tarczay, G.; Magyarfalvi, G.; Vass, E. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2006**, *45*, 1775–1777.
 79. Pohl, G.; Perczel, A.; Vass, E.; Magyarfalvi, G.; Tarczay, G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 4698–4708.
 80. Pohl, G.; Perczel, A.; Vass, E.; Magyarfalvi, G.; Tarczay, G. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2126–2133.
 81. Tarczay, G.; Góbi, S.; Vass, E.; Magyarfalvi, G. *Vib. Spectrosc.* **2009**, *50*, 21–28.
 82. Zehnacker, A.; Suhm, M. A. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2008**, *47*, 6970–6992.
 83. Sadlej, J.; Dobrowolski, J. C.; Rode, J. E.; *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1478–88.
 84. Merten, C.; Xu, Y. *ChemPhysChem* megjelenés alatt, **2012**, doi: 10.1002/cphc.201200758.

Vibrational Optical Activity and the Determination of Absolute Configurations and Conformation

This review article attempts to present the vibrant and quickly developing field of vibrational optical activity to the Hungarian chemical community. We try to put emphasis on the utility of both vibrational circular dichroism (VCD) spectroscopy and Raman optical activity (ROA) measurements in the study of chiral molecules and in the determination of absolute conformation.

In the course of the review the basic physical phenomena of the two methods are introduced together with the historical development timeline of the necessary instrumentation. The historical outlook extends to the introduction of VOA research in Hungary. After a

brief outline of the necessary theoretical background the focus is on the advantages and uses of these methods.

The operation and components of these relatively lesser known instruments are described in hopefully adequate detail before we turn to the description of research taking place at the Eötvös Loránd University.

The authors are gladly obliged to acknowledge the contributions from the funding agencies (KMOP-4.2.1/B-10-2011-000, OTKA K75877, K81175 and TAMOP 4.2.1./B-09/KMR-2010-0003).

Török Ferenc (1929-1981)

FOGARASI Géza*

ELTE TTK Kémiai Intézet, Pázmány sétány 1, 1117 Budapest, Hungary



Török Ferenc (1929-1981)

Hírnév és teljesítmény nem mindig jár együtt: a korán elhunyt Török Ferenc viszonylag kevéssé ismert a kémikus társadalomban, pedig úttörő szerepe volt a magyar elméleti kémia megteremtésében.

Pécsett született 1929. május 30-án. Középiskolai tanulmányait a *Jézustársasági Pécsi Pius-Gimnáziumban* végezte. A kémia „kitüntetett szerepe” már itt megmutatkozott: érettségi bizonyítványa 11 tantárgyat tüntet fel, melyek eredménye mind jeles, egyetlen kivétellel: a „vegytan” csak jó. Elszántságát ez láthatólag nem törte meg, s 1947-ben megkezdte egyetemi tanulmányait az Eötvös Loránd Tudományegyetem (ELTE) vegyész szakán, ahol 1952-ben diplomázott. Szakmai pályafutása a Lengyel Béla professzor vezette Általános és Szeretlen Kémiai Tanszéken indult, s tulajdonképp végig ehhez a helyhez kötődött. 1962-től mintegy tíz évig akadémiai státuszban volt, majd 1971 után újból a Tanszéken oktatott-kutatott, egyetemi tanári beosztásban. 1960-ban *A metilszilikonok egyensúlyi átrendeződéséről* c. értekezése alapján szerezte meg a *kémiai tudományok kandidátusa* fokozatot, majd 1970-ben lett - már elméleti kémiai témában (rezgési erőállandók) - a *kémiai tudományok doktora*. Időközben, még 1967-ben alkalmazott matematikusi diplomát is szerzett. A hetvenes években mi, a környezetében úgy gondoltuk, lassan megérdemelt lenne az akadémiai tagság is, de - az akkori szokásoknak megfelelően - jelezték neki, hogy ehhez illene belépnie a Pártba ...

Kandidátusi értekezése még – az MTA-kutatócsoport profiljának megfelelően – a szilikonkutatásokhoz

kapcsolódott, de már itt is megmutatkozott matematikai-elméleti érdeklődése: polisziloxánok egyensúlyozódásának időfüggését, mint matematikai problémát vizsgálta. (Eltökélttségére jellemző, hogy amikor először matematikusokhoz fordult, ők azt mondták, ezt nem lehet megoldani; ő azonban makacsul, „mint egy cipzárt, legombolyította” a feladatot, s megoldotta problémát.) Ezután még határozottabban fordult az elméleti kémia felé. Ez akkor, a hatvanas évek elején nem létezett önálló tudományterületként, s Török Ferenc rengeteg önképzéssel jutott el oda, hogy körülötte lassan kialakult egy elméleti csoport (Pulay Péter, Fogarasi Géza, Császár Pál, később Pongor Gábor.) A hatvanas-hetvenes évek fordulóján a Török-csoport már nemzetközileg kiemelkedő - itthon még kevésbé elismert - eredményeket mutatott fel. E kutatásoknak különlegességet adott egy akkoriban teljesen új szemlélet, a spektroszkópia és a kvantumkémia sajátos ötvözése.

Az első elméleti (kifejezetten matematikai jellegű) kutatások az infravörös (IR) spektroszkópia *inverz rezgési problémájával* foglalkoztak. Ekkoriban számos kutatócsoportot foglalkoztatott a világban az a kérdés, hogy hogyan lehetne egy molekula rezgési frekvenciáit számításokkal meghatározni. Tisztán elméleti (elektronszerkezeti) módszer még nem jöhetett szóba, viszont egyre több kis molekula *erőterét* (rezgési *erőállandóit*) sikerült meghatározni a kísérleti frekvenciákból.; az erőállandókat aztán nagyobb molekulákra átvive lehetett utóbbiak rezgési frekvenciáit és így spektrumukat közelítőleg számítani, s ezáltal részletesen értelmezni. Probléma volt azonban, hogy a kísérleti *normálrezgenciák* száma általánosságban kisebb, mint a meghatározandó erőállandók száma. Sőt, az adatok számát izotópfrekvenciákkal, vagy akár finomszerkezeti állandókkal is kiegészítve, az inverz probléma még mindig határozatlan maradhat. Török Ferenc ezért egy érdekes kérdést vetett fel: rögzített számú kísérleti adat mellett, ha az erőállandók nem is meghatározottak, milyen *tartományon* belüli értékeik vannak összhangban az adatokkal. Részben Pulayval együtt, ezt a kérdést a hatvanas évek második felében egy hosszú cikksorozatban tárgyalták az *Acta Chimica Hungarica*-ban. Az „*F mátrix paraméteres formája*” módszer rövid életű volt, de rendkívüli mértékben járult hozzá az erőállandó-probléma mély megértéséhez.

Részben az előbb említett kérdéskör vezetett tovább a molekuláris erőállandók tisztán elméleti, az elektronszerkezet számításán alapuló meghatározásához, ami az utóbbi évtizedek egyik legnagyobb magyar sikere a szerkezetkutatás területén. Az *elektronok* Schrödinger-egyenletét a magok helykoordinátáinak függvényében (vagyis elvben nagyon sok maghelyzetre) megoldva, az $E(\mathbf{R})$ függvény jelenti azt a potenciálfelületet, amely a molekularezgéseket meghatározza. Török Ferenc biztatására és támogatásával, Pulay teljes lendülettel fordult a kvantumkémia felé, amihez a technikai lehetőségeket (computer) is megteremtette

* Fogarasi Géza professor emeritus, ELTE TTK Kémiai Intézet, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A. fg@chem.elte.hu

egy 1967/68-as DAAD-ösztöndíj az NSZK-ban. Pulay nevéhez fűződik az *analitikus deriváltak* („erő-módszer”) kidolgozása, mely ma minden kereskedelmi program nélkülözhetetlen része.

Török Ferencnek abszolút meghatározó szerepe volt a kvantumkémia az *oktatásba* való bevezetésében. Két-három évig speciálkollégiumot tartott, majd az „Elméleti Kémia” kötelező, kétféléves kollégiumként bekerült az ELTE vegyészképzésébe. Ezt a világviszonylatban is élenjáró kezdeményezést sokan és sokáig fenntartással nézték. Nagy elégtétel lenne „Feri” számára, ha láthatná, hogy ma már a preparatív szerveskémikusok is szinte mindennapi eszközként „futtatják” a kvantumkémiai programokat.

Az oktatáshoz rögtön egyetemi jegyzet is készült. A 70-es évek legelején megjelent Török-Pulay-féle *Elméleti Kémiát* legalább 25 évig nyomtatták újra. Hasonlóan, részben még ma is használt jegyzet a Török Ferenc szerkesztésében 1974-ben megjelent, maga és munkatársai által írott *A kémiai szerkezetvizsgáló módszerek elmélete* c. jegyzet. Nagyobb igényű, alapvető szakkönyv a Kapuy-Török szerzőpáros *Az atomok és molekulák elektronszerkezete* c. műve, mely máig is meghatározó a téma magyar nyelvű irodalmában.

Török Ferenc jó megjelenésű, magas, erős testalkatú ember volt, azzal a békés, csöndes természettel, mely sokszor épp’ az ilyen embereket jellemzi. Alig tíz-egynéhány évvel volt idősebb nálunk, mégis szinte apának kijáró tisztelettel néztünk fel rá. Az ebéd utáni rendszeres teázásainknak is az ő megnyugtató, fanyar humorral fűszerezett életszemlélete adta meg alaphangulatát. Az már a mélylélektan kérdései közé tartozik, hogy ez a nyugodt, magabiztosnak tűnő férfi élete utolsó éveiben súlyos depresszió áldozata lett, ami hozzájárulhatott sajnálatosan korai halálához. Látva azonban a magyar elméleti kémikusok mai nemzetközi sikereit, meggyőződéssel mondhatjuk, hogy az épület, melynek alapkövét lerakta, erősebben áll, mint valaha.

Török Ferenc publikációi

- Lengyel, B.; Prekopa, A.; Torok, F. “Kinetics and equilibrium of the equilibration reaction of linear methyl polysiloxanes. I”, *Zeitschrift fuer Physikalische Chemie (Leipzig)* **1956**, *206*, 161-8.
- Lengyel, B.; Prekopa, A.; Revesz, P.; Torok, F. “Kinetics and equilibrium of the equilibration reaction of linear methyl polysiloxanes. II”, *Zeitschrift fuer Physikalische Chemie (Leipzig)* **1958**, *208*, 33-41.
- Lengyel, B.; Torok, F. Kinetics and equilibrium in the equilibration reaction of linear methyl polysiloxanes *Zeitschrift fuer Physikalische Chemie (Leipzig)* **1960**, *213*, 289-97.
- Gomory, P.; Torok, F. “The factors which determine the properties of silicone rubber vulcanized at room temperature”, *Ann. Univ. Sci. Budapest. Rolando Eotvos Nominatae, Sect. Chim.* **1961**, *3*, 15-21.
- Pulay, P.; Torok, F. “Application of the method of one-centered molecular orbitals to the investigation of the structure of monosilane”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1964**, *41*, 257-64.
- Csakvari, B.; Szekely, T.; Torok, F. “SiMe₄-BCl₃ and Me₃SiCl-BCl₃ systems”, *Intern. Symp. Organosilicon Chem., Sci. Commun., Prague* **1965**, 104-8.
- Pulay, P.; Torok, F. “Vibration spectra of boron compounds containing the trimethylsilyl radical”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1965**, *45*, 123-9.
- Foldesi, I.; Torok, F. “The infrared spectra of phenoxysilanes and cresoxysilanes”, *Int. Symp. Organosilicon Chem., Sci. Commun.* **1965**, 216-19.
- Pulay, P.; Torok, F. “Parameter representation of the force constant matrix”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1965**, *44*, 287-92.
- Pulay, P.; Torok, F. “Parameter form of matrix F. II. Assignment with the aid of the parameter form”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1966**, *47*, 273-9.
- Torok, F.; Hun, Gy. B. “Vibrational spectrum of the trimethylsilyl group”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1966**, *47*, 329-42.
- Csakvari, B.; Szekely, T.; Torok, F. “The Si(CH₃)₄-BCl₃ and (CH₃)₃SiCl-BCl₃ systems”, *Annales Universitatis Scientiarum Budapestinensis de Rolando Eotvos Nominatae, Sectio Chimica* **1967**, *9*, 111-14.
- Torok, F. “Parameter form of force constants matrix. IV. The forming by parameters of matrices F belonging to a given assignment”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1967**, *52*, 205-13.
- Fogarasi, G.; Torok, F.; Vdovin, V. M. “Vibrational spectra of silacyclohexane derivatives and the siliconcarbon stretching frequencies of various-membered silacycloalkanes”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1967**, *54*, 277-85.
- Pulay, P.; Borossay, Gy.; Torok, F. “General method for calculation of matrices depending on the equilibrium configuration of the molecule by computers”, *J. Mol. Struct.* **1968**, *2*(4), 336-40.
- Torok, F.; Pulay, P. “Parameter form of force-constant matrix V. Maximum and minimum values of force constants”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1968**, *56*, 285-96.
- Torok, F. “Parameter form of force constant matrix. VI. Common force constant matrices of isotopic molecules”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1968**, *57*, 141-5.
- Torok, F.; Hun, B. Gy. “Parameter form of force constant matrix. VIII. Calculation of all mean amplitudes of vibration compatible with normal frequencies”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1969**, *59*, 303-8.
- Torok, F. “Parameter form of the force-constant matrix. IX. Connection between normal and symmetry coordinates”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1969**, *60*, 97-102.
- Torok, F.; Pulay, P.; Hun-Borossay, Gy. “Parameter form of force constant matrix. X. Coriolis coupling constants compatible with the normal frequencies”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1969**, *61*, 39-43.
- Torok, F.; Pulay, P. “Molecular force field investigation with the help of parameter representation of force constants. II. Nitrosyl fluoride”, *J. Mol. Struct.* **1969**, *3*, 283-92.
- Torok, F. “Interaction of the [PtCl₄]²⁻ and K⁺ ions in the K₂PtCl₄ crystal on the basis of its infrared spectrum”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1970**, *63*, 237-41.
- Torok, F.; Paldi, Emil; Dobos, Sandor; Fogarasi, G. “The infrared and NMR spectra of the (Me₂N)₂S, (Me₂N)₂SO, (Me₂N)₂SO₂ and Me₂NSO₂Cl molecules”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1970**, *63*, 417-23.
- Torok, F. “Common force constants of isotopic molecules”, *Izvestiya na Fizicheskiya Institut s ANEB, Bulgarska Akademiya na Naukite* **1971**, *21*, 233-6.
- Torok, F.; Kovacs, G., Edited By: Cyvin, S. J. “Mean amplitudes of vibration compatible with measured normal frequencies”, *Mol. Struct. Vib.* **1972**, 69-84.
- Pulay, P.; Torok, F. “Calculation of molecular geometries and force constants from CNDO [complete neglect of differential overlap] wavefunctions by the force method”, *Mol. Phys.* **1973**, *25*, 1153-61.
- Torok, F.; Hegedus, Agnes; Pulay, P. “Calculation of fully optimized geometries of five- and six-membered differential overlap force method”, *Theor. Chim. Acta* **1973**, *32*, 145-50.
- Torok, F.; Pulay, P.; Szondy, Tamas; Nagy, P. “Ab initio calculations on the sulfur nitride radicals and sulfur nitride(+) ion”, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1974**, *80*, 139-45.

29. Lukovits, I.; Torok, F. "Extreme values of Coriolis coupling constants compatible with the measured normal frequencies", *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1974**, *83*, 309-13.
30. Cyvin, S. J.; Borossay, Gy. H.; Kovacs, G.; Torok, F. "Iterative procedures applied to refined calculations of mean amplitudes of formic acid monomer", *J. Mol. Struct.* **1974**, *21*, 37-40.
31. Pulay, P.; Torok, F. "Calculation of the electronic structure of atoms and molecules by ab initio quantum chemical methods", *Annales Universitatis Scientiarum Budapestinensis de Rolando Eotvos Nominatae, Sectio Chimica* **1975**, *14*, 11-46.
32. Pulay, P.; Torok, F. "Force constants, vibrational assignment, and geometry of methyl amine from Hartree-Fock calculations", *J. Mol. Struct.* **1975**, *29*, 239-46.
33. Panchenko, Yu. N.; Pulay, P.; Torok, F. "Prediction of vibrational spectra by the CNDO/2 force method. II. The calculation of vibrational frequencies of cis and trans forms of glyoxal, acrolein and 1,3-butadiene", *J. Mol. Struct.* **1976**, *34*, 283-9.
34. Torok, F.; Hegedus, A.; Kosa, K.; Pulay, P. "Prediction of vibrational spectra by the CNDO/2 force method. I. Out-of-plane vibrations of benzene and fluorobenzenes", *J. Mol. Struct.* **1976**, *32*, 93-9.
35. Torok, F.; Pulay, P. "Calculation of force constants by semiempirical quantum chemical method", *J. Mol. Struct.* **1978**, *46*, 43-7.
36. Fogarasi, G.; Pulay, P.; Torok, F.; Boggs, J. E. "The geometry of some amides obtained from ab initio calculations", *J. Mol. Struct.* **1979**, *57*, 259-70.
37. Panchenko, Yu. N.; Mochalov, V. I.; Pupyshv, V. I.; Stepanov, N. F.; Torok, F.; Pulay, P.; Fogarasi, G.; Pongor, G. "Prediction of vibrational spectra of propylene and its deuterated analogs by the CNDO/2 force method", *Vestnik Moskovskogo Universiteta, Seriya 2: Khimiya* **1980**, *21(5)*, 453-7.
38. Panchenko, Yu. N.; Csaszar, P.; Torok, F. "Vibrational spectra of trans- and cis-1,3,5-hexatrienes and their 2,3,4,5-tetradeutero analogs", *Acta Chim. Hung.* **1983**, *113*, 149-58.
39. Panchenko, Yu. N.; Mochalov, V. I.; Csaszar, P.; Torok, F.; Benedetti, E.; Aglietto, M. "Theoretical interpretation of the vibrational spectra of trans- and cis-penta-1,3-dienes and 2,3-dimethylbutadiene", *Acta Chim. Hung.* **1983**, *114*, 149-57.

Magyarul

40. Torok, F.; Gomory, P. "Preparation of macromolecular dimethyl polysiloxanes suitable for production of silicone gum, in the presence of alkaline catalysts", *Magyar Kémiai Folyóirat* **1960**, *66*, 70-3.
41. Gomory, Pal; Torok, F. "Factors determining the properties of cold-vulcanizing silicone rubber", *Magyar Kémiai Folyóirat* **1961**, *67*, 346-9.
42. Gebhardt, I.; Lengyel, B.; Torok, F. "Preparation of poly(dimethylsiloxanediol)", *Magyar Kémiai Folyóirat* **1962**, *68*, 159-61.
43. Torok, F.; Pulay, P. "Calculation of the electronic structure of atoms and molecules", *Kémiai Közlemények* **1970**, *34*, 303-25.
44. Torok, F. "Gillespie method and molecular shape", *Fizikai Szemle* **1975**, *25*, 77-9.
45. Hegedus, A.; Kosa, K.; Pulay, P.; Torok, F. "Quantum chemical calculation of the spectra of aromatic compounds originating from vibrations perpendicular to their planes", *Kémiai Közlemények* **1976**, *46*, 428-30.
46. Torok, F. "Fifty years of quantum chemistry", *Fizikai Szemle* **1977**, *27*, 401-2.
47. Torok, F. "Evolution of the concept of chemical valence", *Fizikai Szemle* **1977**, *27*, 417-18.
48. Torok, F. "Molecular orbital theory of the electronic structure of inorganic molecules and ions", *Magyar Kemikusok Lapja* **1977**, *32*, 44-51.

Könyv

49. Kapuy, E.; Török, F. *Az atomok és molekulák kvantumelmélete*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1975**.

A fémipartól az egyetemi katedráig Török Tibor életútja (1914-1999)

ZÁRAY Gyula^{a,b,*}

^aELTE TTK Kémiai Intézet Analitikai Kémiai Tanszék, Pázmány Péter sétány 1/A, 1117 Budapest, Magyarország

^bELTE Környezettudományi Kooperációs Kutató Központ, Pázmány Péter sétány 1/A, 1117 Budapest, Magyarország



Török Tibor (1914-1999)

Török Tibor 1914. november 12.-én született Debrecenben, polgári családban. Érdeklődése már tíz éves korától a természettudományok felé fordult, s ebben nagy szerepet játszott az édesapjától kapott diáklaboratórium. Egyetemi tanulmányait a Debreceni Tudományegyetemen végezte, ahol 1938-ban kémia-fizika szakos tanári diplomát szerzett, majd 1939-ben vegyész doktorátust tett. 1936-ban, még egyetemi tanulmányai során, Bodnár professzor három hónapos tanulmányútra küldte a müncheni egyetemre, ahol Walther Gerlach professzornál ismerkedett meg a színeképelemzéssel. Elsőéves egyetemista korától először, mint externista, 1935-től pedig a Debreceni Tudományegyetem Vegytani Intézetének kinevezett díjtalan gyakornoka, majd féldíjas vegyész-növendéke volt. A tanszéken berendezett egy Zeiss Q-24 spektrográffal és leydeni palackokkal felszerelt színeképelemző laboratóriumot.

1940-ben megnősült, és a Budapesti Haditechnikai Intézet polgári vegyésze lett, majd a Csepeli Weiss Manfréd Repülőgépgyárba került. Itt Korbuly László igazgató a gyors és pontos alumíniumelemzést lehetővé tevő színeképlaboratórium létesítésével bízta meg. 1944 decemberében a nagy értékű, pótolhatatlan műszereket a Németországba telepítés elől a solymári tégláégető kemencékbe menekítették, majd 1945 elején visszahozták a gyárba. Sikertelenül megmenteni a laboratórium 120 g-ot kitevő platinakészletét is. A többé-kevésbé megsérült

*Záray Gyula, egyetemi tanár; email: zaray@ludens.elte.hu

kényes műszereket a gyári műhelyek, a GAMMA, a MOM és más cégek segítségével pár hónap alatt sikerült megjavítani, és újraindulhatott a laboratóriumi munka. Tervei alapján új szikragerjesztőt és nyomelemzésekhez ívgerjesztő berendezést építettek, továbbá sorozatelemzésre alkalmas, biztonságos szikraállványt, stabilizált feszültséget szolgáltató áramátalakítót készítettek. A beszerezhetetlen speciális fényképlemezek helyett olcsóbb filmanyaghoz használható, eredeti megoldású spektrográf-filmkazzettát szerkesztettek. A színeképvonal-fotométer elavult, fényelemes mérőrészt korszerű fotocellás-elektroncsöves, hazai készítésű berendezéssel váltották fel. Szabványosították, és jelentős mértékben automatizálták a színeképelemzési sorozatvizsgálatok munkamenetét, megvalósították az emulzió gyors, reprodukálható kidolgozását, infravörös szárítását. Alumínium összehasonlító minták házi előállítására rendezkedtek be. Új, hordozható spektroszkópot építettek helyszíni vizsgálatok céljára, mellyel megoldották a raktárakban, műhelyekben felhalmozódott, összekeveredett anyagok szétválogatását, több millió forint megtakarítást elérve a feldolgozásuk során.

Az ipari laboratóriumban folytatott kutató-fejlesztő tevékenysége mellett Schulek professzor meghívására 1948-tól előadásokat tartott az Eötvös Loránd Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén, ahol 1950-ben spektrográfias laboratóriumot rendezett be Szakács Ottó tanársegéd közreműködésével. Hivatalosan 1952-ben egyetemi docensi, majd 1963-ban egyetemi tanári kinevezést kapott.

A tanszéken kialakított laboratóriumban egyrészt ipari-analitikai, másrészt alap kutatás jellegű tudományos munkával, valamint új színeképelemző berendezések kifejlesztésével foglalkozott. Így született meg a Barabás János optikus-főmérnökkel közösen tervezett, színeképelemzés céljaira alkalmas hazai anyagvizsgáló spektroszkóp az ötvenes évek elején, majd ennek nagyteljesítményű binokuláris, intenzitásmérő változata. Ezt követően Bajáki László elektromérnök közreműködésével az első hazai elektromos-analóg kiértékelő számítógépet, a Spectrator-t is megalkották. A sorozatban gyártott készülékek itthon és külföldön egyaránt alkalmazást nyertek.

A tanszéken folyó oktatási és kutatási tevékenységén túlmenően nagy súlyt helyezett a tudományszervezési feladatok megoldására. 1952. április 8.-án az ELTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Színeképelemző Laboratóriumába megbeszélésre hívott hét, színeképelemzéssel foglalkozó hazai szakembert annak érdekében, hogy elősegítsék a szakmai információk átadását. Ezt követően május 9.-én már 24 résztvevővel ülésztettek a

BME Általános Kémiai Tanszékén, Erdey László professzor vezetésével és bizottsággá szerveződve szeptember 12.-én a KFKI Spektroszkópiai Osztályán megtartották első, laboratórium-látogatással egybekötött előadói ülésüket.

Az ismeretterjesztő előadássorozatok mellett a nemzetközi szakirodalom figyelését is megszervezték. Ebben az időben alakult meg Dr. Réti Pál főmérnök szervezésével a GTE Technológiai Szakosztályának Anyagvizsgáló Szakbizottsága, melyhez 1953. június 20.-án csatlakoztak hivatalos munkabizottságként a színeképelemzők. 1953 őszén egyéves továbbképző tanfolyamot indítottak az alapvető spektroszkópiai ismeretek elsajátítására, havonta tartott népes összejövetelekkel. Irodalomfigyelő szolgálatot működtettek, és egymás gondjain tanácsokkal, anyagokkal, eszközökkel segítettek. Az előadások anyagát 1955-től sokszorosítva juttatták el a hazai szakemberekhez. 1956 tavaszán nagy érdeklődéssel kísért ipari anyagvizsgáló spektroszkópos tanfolyamot tartottak, melyet Kéthelyi József közreműködésével közel húsz éven keresztül évente megrendeztek. Esetenként spektrográfias tanfolyamokkal is gazdagították a képzést. Amikor 1957-ben az Anyagvizsgáló Szakbizottság önálló Anyagvizsgáló Szakosztállyá vált, a munkabizottság Színeképelemző Szakbizottságként, majd pedig Spektrokémiai Társaság névvel folytatta működését, amelynek elnöki teendőit 1952-től 1979-ig Török Tibor látta el.

1957-ben Macher Frigyes soproni színeképelemző kolléga hívására háromnapos konferenciát szerveztek, amelyen 29 hazai és 2 külföldi előadó ismertette legújabb tudományos eredményeit, és alkalom nyílt a személyes tapasztalatcserére. Ez volt az első Magyar Színeképelemző Vándorgyűlés, amelyet ettől kezdve évenként rendeztek meg hazánk különböző városaiban, többek között Veszprémben, Balatonszéplakon, Gyulán, Sárospatakon, Szekszárdon, Nyíregyházán, Debrecenben. E rendezvénysorozatnak 1979-ig volt elnöke.



Török Tibor beszédet mond a Gödöllői Egyetemen 1980-ban tartott XXIII. Magyar Színeképelemző Vándorgyűlés megnyitóján.

A korlátozott külföldi utazási lehetőségek miatt először csak 1955-ben vehettek részt magyar színeképelemzők nemzetközi konferencián, amikor a Tátralomnicon tartott Conference on Analytical Atomic Spectroscopy (CANAS) rendezvényen számoltak be kutatási eredményeikről. A következő konferencia 1956-ban az amszterdami Colloquium Spectroscopicum Intertantionale (CSI) volt, amelynek

fogadásán Török Tibor felvetette, hogy Magyarország is szívesen otthont adna e jeles rendezvénynek. Erre egy évtized múltán került sor, amikor a XIV. CSI-nek 1967-ben Debrecen városa adott otthont, amelynek elnöki teendőit Török Tibor látta el.

E sorok írója számára nagy megtiszteltetés volt, hogy az 1969-ben indult, az üreghatódos sugárforrások fejlesztésére irányuló kutatásai szakdolgozóként, majd doktoranduszként és aspiránsként bekapcsolódhatott. Török professzor úr tervei szerint megépítettünk egy cseppfolyós levegővel hűtött iker-üreghatódos berendezést, amely, mint optikai emissziós sugárforrás elméletileg két fontos tulajdonsággal rendelkezett. Az egyik az emittált spektrumban lévő színeképvonalak csekély félérték-szélessége, amely lehetővé tette a színeképvonalak finomszerkezetének feltárását és ezen keresztül az izotóparányok meghatározását. A másik az üreghatódba bevitt vizsgálandó minta atomjainak az üreghatódos belüli nagy tartózkodási ideje, ami biztosította ugyanazon atom egymást követő többszöri „vallatását”, és ezen keresztül kis kimutatási határok (ng/ml) elérését. Egy nagyfelbontású Fabry-Perot interferométer-spektrométerrel kapcsolt analitikai rendszerrel nyert kísérleti eredményekről a Spectrochimica Acta folyóiratban közölt cikksorozatban számoltunk be. Időközben az izotópanalízis területén a tömegspektrometriai módszerek jobb analitikai teljesítőképességet tudtak felmutatni, míg a nyomelemzés területén megjelent az induktív csatolású plazma optikai emissziós, majd tömegspektrometriai módszer, amelyek az üreghatódos kisülésszerű sugárforrások alkalmazását háttérbe szorították.

Az Akadémiai Kiadónál 1968-ban jelent meg a Mika József professzorral közösen írt „Emissziós színeképelemzés” című könyvének első kötete, amelyben az elméleti alapokat és a különböző sugárforrásokban (egyen- és váltóáramú ívplazmák, a kis-, közép- és nagyfeszültségű szikrakisülések, valamint a gázkisülésszerű plazmák) lejátszódó fizikai folyamatokat tárgyalták. A könyv második kötete 1974-ben látott napvilágot. Ebben a gyakorlati szakemberek számára adtak áttekintést az emissziós színeképelemzési módszer alkalmazási lehetőségeiről, a különböző halmazállapotú minták multi-elemes vizsgálatáról. Az Akadémiai Díjjal jutalmazott könyv mindkét kötetét a kiadó angol nyelven is megjelentette 1973-ban és 1978-ban. Ugyancsak jelentős sikerként könyvelhette el, hogy Zimmer Károly professzorral közösen írt, angol nyelvű könyvét „Quantitative Evaluation of Spectrograms by means of L-transformation” címmel az Akadémiai Kiadó 1972-ben megjelentette. Ezen könyveken túlmenően, mintegy 100 tudományos publikációnak szerzője, illetve társszerzője és számos hazai és nemzetközi konferencián képviselte a magyar színeképelemzőket meghívott előadóként.

Eredményeit 1953-ban a Kossuth-díj bronz fokozatával, és a Munka Érdemrend arany fokozatával ismerték el. Kimagasló hazai és nemzetközi szintű tudányszervezői tevékenységéért a Gépipari Tudományos Egyesülettől Pattantyus díjat, míg a Csehszlovák Spektroszkópiai Társaságtól Johannes Marcus Marci emlékérmét kapott. Tudományos munkásságának régen megérdemelt, de kései elismeréseként az MTA elnöke 1993 novemberében Eötvös József-koszorúval tüntette ki.

A kutatómunkától visszavonulását követően a vallás és a természettudomány kapcsolatával foglalkozott szóban és írásban, magánemberként és a Református Egyház presbitereként. Életét négy alappillér határozta meg: a szakma, a család, a barátok-kollégák szeretete és a nehéz időkben is bátran vállalt vallásosság. Az embertársai iránti szeretete és a mély meggyőződésen nyugvó hite egyaránt áthatotta személyes és szakmai kapcsolatait, egészen 1999-ben bekövetkezett haláláig. Idős korára elveszítette látását. Súlyos fizikai megpróbáltatásaira a kárpótlást szerett családjában, három gyermekében, hat unokájában, rokonaiban és jó barátaiban találta meg.

Tiszteletére 1999-ben a Spektrokémiai Társaság Török Tibor Emlékéremet alapított. Tanítványai és egyetemi kollégái Török Tibor professzor úr munkássága és emléke előtt tisztelegve, a laboratóriumot, ahol az induktív csatolású plazma ionforrással kapcsolt nagyfelbontású tömegspektrométer működik, róla nevezték el.

Válogatott közleményei:

1. Török, T.; Szikora, G. *Acta Techn. Acad. Sci. Hung.* **1955**, 13, 165.
2. Török, T.; Cséti, S. *Mikrochim. Acta*, **1958**, 538.
3. Török, T.; Szakács, O.; Szabó, Z.L. *Magyar Kém. Foly.* **1960**, 66, 487.
4. Török, T.; Zimmer, K. *Magyar Kém. Foly.* **1960**, 66, 477.
5. Zimmer, K.; Török, T. *Acta Chim. Hung.* **1961**, 28, 59.
6. Török, T.; Zenta, P. *Acta Chim. Hung.* **1962**, 30, 11.
7. Török, T.; Záray, Gy. *Spectrochim. Acta B.* **1975**, 30, 157–162.
8. Török, T.; Buzási, A.; Záray, Gy. *Spectrochim. Acta B.* **1976**, 31, 501–508.
9. Heltai, G.; Török, T. *Spectrochim. Acta B.* **1977**, 32, 107–114.
10. Török, T.; Záray, Gy. *Spectrochim. Acta B.* **1978**, 33, 101–113.
11. Török, T.; Záray, Gy. *Spectrochim. Acta B.* **1978**, 33, 115–121.
12. Török, T.; Hafenschner, I. *Spectrochim. Acta B.* **1978**, 33, 283–290.
13. Török, T.; Záray, Gy.; Rehák, N. *Spectrochim. Acta B.* **1982**, 37, 171–176.
14. Záray, Gy.; Török, T.; Rehák, N. *Spectrochim. Acta B.* **1984**, 39, 57–62.
15. Török, T. *Istenhit és természettudomány – Egy öreg tanár hitvallása*, Kálvin János Kiadó: Budapest, **1996**.